# Untersuchungen an Keimzelltumoren des Hodens zum immunhistologischen Nachweis von Tissue-Polypeptide-Antigen (TPA) und von Zytokeratin

Gustavo Bruno Baretton

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546002_0015

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med.M.Eder

# Untersuchungen an Keimzelltumoren des Hodens zum immunhistologischen Nachweis von Tissue-Polypeptide-Antigen (TPA) und von Zytokeratin.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gustavo Bruno Baretton
aus
München
1984

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. med. Löhrs

Mitberichterstatter: Prof. med. Eder

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Herrn Prof. Dr.med. Udo Löhrs gewidmet

GLIEDERUNG : Seite:

1. EINLEITUNG..... 4
2. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG:
2.1. Die Hodentumoren..... 6
2.1.1. Histogenese der testikulären Tumoren..... 6
2.1.1.1. Die Keimzelltheorie..... 6
2.1.1.2. Die Blastomerentheroie..... 10
2.1.1.3. Weitere Theorien..... 11
2.1.1.3.1. Die Theorie vom eingeschlossenen Zwilling.... 11
2.1.1.3.2. Die Theorie der extraembryonalen Zelle..... 12
2.1.1.3.3. Die vereinigende Hypothese..... 12
2.1.2. Das Problem der Keimzelltumor-Klassifikation..... 16
2.1.2.1. Die WHO-Nomenklatur..... 16
2.1.2.2. Die TTP-Nomenklatur..... 16
2.1.2.3. Weitere testikuläre Geschwülste..... 18

2.2. Die Antigene..... 19
2.2.1. Der hypothetische Ansatz..... 19
2.2.1.2. Biochemie des TPA..... 19
2.2.1.3. Die "Tumorassoziation"..... 20
2.2.1.4. Zellbiologisches Vorkommen des TPA..... 21
2.2.1.5. Das Zytoskelett..... 22
2.2.1.6. TPA-Lokalisation in Normalgeweben..... 24
2.2.1.7. TPA-Lokalisation in Malignomgeweben..... 25
2.2.2. Die Keratinfraktion LP-34..... 25

3. MATERIAL:..... 26

4. METHODE:
4.1. Die indirekte Immun-Peroxidase-Methode..... 34
4.1.1. Herstellung der Schnitte..... 34
4.1.2. Entparaffinierung..... 34
4.1.3. Protease-Vorbehandlung..... 34
4.1.4. Unspezifische Vorbehandlung..... 35
4.1.5. Darstellen des gesuchten Antigens mit
dem 1. Antikörper..... 36

4.1.6. Darstellung der AG-AK-Reaktion mit dem 2. Antikörper..... 37
4.1.7. Peroxidasereaktion..... 37
4.1.8. Gegenfärbung..... 38
4.1.9. Eindecken der Präparate..... 38

4.2. Spezielle Anmerkungen zur Methode..... 39
4.2.1. Einfluß von Formalinfixierung und Protease-vorbehandlung auf die Gewebereaktivität..... 39
4.2.2. Einfluß zu hoher Temperatur..... 40

5. ERGEBNISSE:
5.1. Nicht-seminomatöse Keimzelltumoren und nicht-seminomatöse Anteile der Kombinationstumoren..... 47
5.1.1. Differenzierte Teratome/Teratome..... 47
5.1.1.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA..... 47
5.1.1.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34..... 49
5.1.2. Maligne Teratome vom Intermediärtyp/ Teratome plus Embryonale Karzinome..... 54
5.1.2.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA..... 54
5.1.2.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34..... 57
5.1.3. Maligne Teratome vom undifferenzierten Typ/ Embryonale Karzinome..... 60
5.1.3.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA..... 61
5.1.3.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34..... 62
5.1.4. Maligne Teratome vom trophoblastischen Typ/ (Teratome plus) Embryonale Karzinome plus Chorionkarzinome..... 64
5.1.4.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA..... 65
5.1.4.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34..... 66

5.2. Seminomatöse Keimzelltumoren und seminomatöse Anteile der Kombinationstumoren..... 69
5.2.1. Darstellung der Untergruppen..... 69
5.2.1.1. Klassischer Typ..... 69

5.2.1.2. Seminom mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen..... 69
5.2.1.3. Seminoma in situ..... 70
5.2.1.4. Anaplastischer/Atypischer Typ..... 70
5.2.1.5. Spermatozytäres Seminom..... 71
5.2.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA..... 71
5.2.3. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34..... 72

5.3. Weitere Tumoren des Hodens und Skrotalinhaltes..... 74
5.3.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA..... 74
5.3.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34..... 75

6. DISKUSSION..... 76

7. ZUSAMMENFASSUNG..... 87

8. LITERATURVERZEICHNIS..... 90

## 1. EINLEITUNG:

Die malignen Hodentumoren gehören zu den für Kliniker und Pathologen am schwierigsten zu handhabenden Organtumoren. Der Grund dafür liegt in der verwirrenden histologischen Heterogenität und Komplexität, und damit verknüft in dem unterschiedlichen biologischen Verhalten. Morphologisch unterscheidet man seminomatöse und nicht-seminomatöse Neubildungen. Kontrovers bleibt jedoch bis heute die Theorie der Histogenese und damit der Klassifikation, problematisch die schnelle und sichere morphologische Einordnung in Gruppen mit prognostischer und therapeutischer Relevanz.

Immunhistochemische und serologische Methoden haben hier zu einer wesentlichen Erleichterung in der Diagnostik geführt.
Alpha-1-Fetoprotein (AFP) und das humane Chorion-Gonadotropin (HCG) konnten sich, wegen der guten Übereinstimmung klinisch-serologischer und immunhistochemischer Befunde, als testikuläre Tumormarker durchsetzen (JAVADPOUR 1980, MANN et al. 1981).

Aufgabe dieser Arbeit soll es sein zu prüfen, ob durch den immunhistochemischen Nachweis des tumorassoziierten Tissue-Polypeptide-Antigen (TPA) und der Keratinfraktion LP 34 in Keimzelltumoren neue Aspekte zum theoretischen Verständnis und für die praktische Diagnostik in dieser Tumorgruppe gewonnen werden können.
Es wurde untersucht, in welchen Tumorzellen die beiden Skleroproteine auftreten und ob Vergleiche mit Normalgeweben oder nicht-germinalen Tumoren möglich sind.
Da bisher immunhistologische Studien über die Lokalisation von TPA in Tumoren noch weitgehend

fehlen, konnten widersprüchliche serologische Ergebnisse zwischen verschiedenen Organtumorkollektiven und innerhalb einzelner Tumorgruppen nicht geklärt werden. (BJÖRKLUND et al. 1973, MENENDEZ-BOTET et al. 1978, SKRYTEN et al. 1981).
Auch die Behauptung, das TPA sei ein "Proliferations-Antigen" (SKRYTEN et al. 1981), stützt sich nur auf klinisch faßbare Parameter.
Schließlich soll die Frage des Wertes einer routinemäßigen immunhistologischen Anti-TPA-/Anti-LP 34 Reaktion in der Differentialdiagnose maligner Tumoren beantwortet werden.

Gerade wegen ihrer Vielgestaltigkeit bieten sich die Keimzelltumoren des Hodens als Modell für diese Fragestellung an.

## 2. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

### 2.1. Hodentumoren

#### 2.1.1. Histogenese der testikulären Tumoren

Die morphologische Vielgestaltigkeit der in den testikulären Tumoren vorkommenden Gewebe macht es schier unmöglich, ohne weiteres auf das Ausgangsgewebe, auf die "transformierte Ursprungszelle" zurückzuschließen, wie dies bei anderen Tumoren, z.B. Plattenepithel- oder Adenokarzinom, leicht gelingt.
Erschwerend kommt hinzu, daß bei ca. 50% der Hodentumoren verschiedene Tumortypen nebeneinander vorliegen (MOSTOFI 1977, S. 27).
Die Entstehungstheorien sind experimentell und empirisch mehr oder minder gut belegbar. Im folgenden wird ein kurzer Überblick gegeben.

##### 2.1.1.1. Die Keimzelltheorie

Die Keimzelltheorie postuliert als Ursprungszelle die unreifen totipotenten Keimzellen (KZ). Aus ihnen entwickeln sich sowohl die embryonalen und extraembryonalen Gewebeanteile der Teratome (TEILUM, 1971) über unreifere Vorstufen (Embryonales Karzinom), als auch die Seminomzellen (s. Abb.1 oberer Teil).

Für die Keimzelltheorie sprechen empirische Daten:
a. Die Tendenz der Teratome - bei Erwachsenen - hauptsächlich in den Gonaden aufzutreten (GONZALEZ-CRUSSI 1982, S. 12).
b. Das Vorkommen extragonadaler Teratome v.a. median oder nahe der Medianlinie, entsprechend dem embryonalen Entstehungsort der Keimzellen.

Darüberhinaus ergeben sich experimentelle Hinweise:

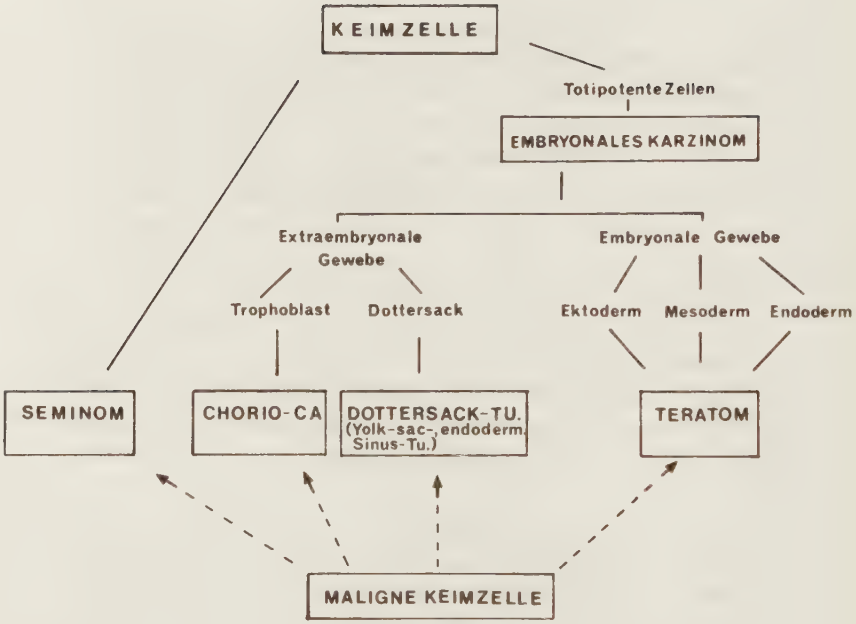



Abb. 1:
Die Histogenese der Hodentumoren nach TEILUM modifiziert nach MOSTOFI.

a. Die Entstehung künstlich induzierter Teratome an der Innenseite der Tubuli seminiferi, wo als Präkursoren nur KZ oder Sertoli-Zellen in Frage kommen (STEVENS 1967).
Parallel dazu lassen sich beim Menschen in der Nachbarschaft von Hodenteratomen zytologische Dysplasien von intratubulären KZ beobachten (sog. "In situ-Veränderungen"); den malignen Charakter dieser Atypien konnte SKAEKKEBAEK (1978) in einer prospektiven Studie nachweisen.
MOSTOFI (1980) sieht in dem direkten Hervorgehen der Teratome aus maligne entarteten, intratubulären Keimzellen einen zweiten Entwicklungsweg (sog."Direkte KZ-Transformation"); die Richtung der weiteren Differenzierung wird dann durch die lokalen Bedingungen des "Micro-Environment" determiniert (s. Abb. 1, unterer Teil).

b. In Transplantationsversuchen konnten Stenvens und Mitarbeiter durch Übertragung von keimzellhaltigen Genitalwülsten männlicher Mäuseembryonen des 11.- 13. Gestationstages auf Hoden erwachsener, isogenetischer Mäuse Teratome erzeugen, während dies bei Mäusen, deren Genitalwülste aufgrund genetischer Faktoren kaum KZ enthalten, mißlang (STEVENS 1967).

Versuche, einen Tumor vom trophoblastischen Typ (siehe unten) oder ein Seminom experimentell zu induzieren, blieben bis heute erfolglos. Jedoch fanden PIERCE und ABELL (1970), als sie in die Backentasche von immunsupprimierten Hamstern Chorionkarzinome des Menschen verpflanzten, große Ähnlichkeit der Zytotrophoblastzellen mit solchen eines embryonalen Karzinoms. Sie folgerten, daß sich der Zytotrophoblast aus dem embryonalen Karzinom entwickelt und selbst zum Synzytiotrophoblast weiter differenziert. Beim Seminom bestehen

durch Vergleichsbeobachtungen mit der normalen Spermatogenese ausreichende Argumente für die These, daß die Tumorzellen auf KZ zurückgehen, die sich analog der Spermatogenese differenzieren.

c. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse von PIERCE und BEALS (1964) zeigen, daß ultrastrukturell primordiale KZ fetaler Mäuse und Zellen des embryonalen Karzinoms aus einem induzierten Teratokarzinoms der Maus keine morphologischen Unterschiede aufweisen.

Bedenken gibt jedoch GONZALEZ-CRUSSI (1982) bezüglich der Allgemeingültigkeit der Keimzelltheorie an:
1. Inwieweit sind grundsätzlich Ergebnisse aus Tiermodellen auf Verhältnisse beim Menschen übertragbar?
2. Die unterschiedlichen klinischen Charakteristika von Teratomen verschiedenen Ursprungortes (gonadal/ extragonadal) stellen die universelle Anwendbarkeit einer einzigen Theorie in Frage.
3. Der ungeklärte Mechanismus der Tumorinitiation, wobei eine direkte Entstehung aus haploiden KZ unwahrscheinlich erscheint.
(Der letztgenannte Punkt steht für diese Arbeit nicht zur Diskussion.)

Weiter lassen sich Gesichtspunkte aus der Praxis mit der ursprünglichen Theorie nicht vereinbaren:
1. Die völlig unterschiedliche Zusammensetzung der histologischen Tumortypen bei Kindern: Seminome kommen praktisch nicht vor, das Spektrum der Teratome beschränkt sich auf Dottersacktumoren und reife, differenzierte Teratome (s.u.).
2. Der histologische Nachweis undifferenzierter Strukturen in den Metastasen völlig differenzierter Primärtumoren, mit der Prämisse, daß im Primärtumor keine embryonalen Karzinomanteile übersehen wurden (LÖHRS 1982).

Erst die oben erwähnte Erweiterung durch MOSTOFI mit der Einbeziehung des Einflusses lokaler Faktoren im Tumor - dem "Micro-Environment" - auf die endgültige histologische Determination, vermag diese Widersprüche zu lösen.

Es bleibt anzumerken, daß das erweiterte Konzept der Keimzelltheorie die empirisch oder experimentell gewonnenen Erkenntnisse über die seminomatösen und nichtseminomatösen Neubildungen des Testikels schlüssig zu belegen vermag und somit die übrigen Theorien zur Histogenese entbehrlich erscheinen läßt (LÖHRS 1982). Wenn auch der endgültige Beweis, nämlich die Induktion eines Teratoms bzw. Seminoms durch menschliche Keimzellen noch aussteht, berechtigen die genannten Ausführungen im folgenden von seminomatösen- bzw. nichtseminomatösen Keimzelltumoren (KZT) zu sprechen.

2.1.1.2. Die Blastomeren-Theorie

Nach dieser Theorie entgehen Zellhaufen der frühen Embryogenese im Blastozysten-Stadium (7.-9. Tag) dem Einfluß des primären Organisators und schreiten fort, sich entsprechend der eigenen inhärenten Multipotenz zu differenzieren. Jede der dabei gebildeten embryoiden Strukturen ist dabei ein Zufallsprodukt. Das Teratom wird als Analogon zu den anderen embryonalen Tumoren, z.B. des Nervensystems, der Niere oder der Leber gesehen, nur daß bei diesen die morphogenetische Potenz bereits weiter eingeschränkt ist (PUGH u. CAMERON, in Pugh, 1976, S.201).
Ursprüngliche hypothetische und experimentelle Überlegungen gehen auf Askanazy (1907) zurück, der sich auf die embryologischen Arbeiten von Spemann (1901-3) stützte.
Needham (1942) baute die Blastomerentheorie mit sei-

nen Arbeiten über die chemische Organisation des Embryos weiter aus.
Auch für diesen Ansatz, in dessen Mittelpunkt die frühe Embryonalzelle steht, liegen erfolgreiche Transplantationsversuche im Tiermodell vor. Die übertragenen Embryonalzellen vermögen nur bis zum 7. Gestationstag im Empfängertier Teratome zu bilden (DAMJANOV und SOLTER 1974; STEVENS 1968 und 1970).

Ebenso bestehen biochemische, morphologische und immunologische Ähnlichkeiten zwischen Embryonalzellen und den Stammzellen eines experimentellen Teratoms (GONZALEZ-CRUSSI 1982, S. 15).

Gegen die Blastomeren-Hypothese lassen sich folgende Argumente anführen:
1. Vorkommen von seminomatösen und nicht-seminomatösen KZT nebeneinander.
WILLIS (1960) hält an der Ansicht fest, daß Seminome, auch wenn sie mit Teratomen gemeinsam vorkommen, histogenetisch andersgeartete und unabhängige Neoplasien darstellen.
2. Gegen diese Hypothese spricht auch die Altersverteilung der Patienten mit Teratomen, mit dem Altersgipfel von 29,8 Jahren (PUGH u. CAMERON, in Pugh 1976, S.206), im Vergleich zu den praktisch ausschließlich in der Kindheit auftretenden embryonalen Tumoren, wie z.B. Nephroblastom und Neuroblastom.

2.1.1.3. Weitere Theorien

Neben den beiden Haupttheorien zur Histogenese existierten bzw. existieren noch andere Modelle.

2.1.1.3.1. Die Theorie vom "Eingeschlossenen Zwilling"

Die Unhaltbarkeit der These, daß Teratome retinierte

Doppelbildungen darstellen, wurde von NICHOLSON (1950) in einer umfangreichen Studie unter Beweis gestellt. Als Hauptunterschiede sind zu nennen:
1. Teratome sind gekennzeichnet durch eine immanente Proliferationsfähigkeit, die sie - wie die malignen Eigenschaften - mit echten bösartigen Tumoren teilen.
2. Die Ausbildung einer Wirbelsäule oder zumindest eines primitiven Achsenskeletts, das eine gewisse Symmetrie offenbart und selbst bei unreifsten Wirbeltierembryonen nachweisbar ist, fehlt bei den Teratomen. Die gewebliche Assoziation ist vielmehr, trotz organoid anmutender Strukturen, rein zufallsbedingt.

2.1.1.3.2. Die Theorie der "Extraembryonalen Zelle". Sie stützt sich auf die experimentellen Befunde der fakultativen Multipotenz des parietalen (VANDEPUTTE et al. 1973) bzw. viszeralen (PAYNE und PAYNE 1961) Dottersackes bei Nagetieren. In der Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen sehen die genannten Autoren einen möglichen Entstehungsweg für Teratome. Dabei ist ein Übertragen dieser Ergebnisse auf Verhältnisse beim Menschen äußerst problematisch, da sich bereits rein anatomisch der Dottsack des Menschen und eines Nagetieres wesentlich unterscheiden.

2.1.1.3.3. Die "Vereinigende Hypothese".
DAMJANOV und SOLTER (1974) versuchen eine Synthese zwischen Keimzell- und Blastomerentheorie herzustellen, indem sie die Stammzellen aller Teratokarzinome, ungeachtet ihres Ursprunges oder der Art ihrer Induktion, als äquivalent, um nicht zu sagen als identisch ansehen.

Die Kontroversen über die Histogenese verhindern bis heute eine einheitliche, international akzeptierte Klassifikation, die dem Postulat der Tumorpathologie entsprechend auf einem einheitlichen und überzeugenden histogenetischen Konzept beruht.

Diese grundlegende Problematik beim Umgang mit Hodentumoren scheint zunächst nur für den Pathologen relevant, sie bekommt aber einen anderen als nur akademischen Stellenwert, wenn man die praktischen Konsequenzen betrachtet.
Bei malignen Tumoren ist der Kliniker auf eine exakte Diagnose angewiesen, die es ihm ermöglicht, therapeutische Strategien zu entwickeln und auf ihre Effektivität hin zu vergleichen. Darüberhinaus bedarf es eines Klassifikationssystems, das es dem Kliniker erlaubt, schnell die richtigen differentialtherapeutischen Maßnahmen zu treffen.
Die modernen Ansätze der Onkologie propagieren eine differenzierte Therapie der Keimzelltumoren:
a. Seminomatöse Neubildungen werden nach der Orchiektomie einer Hochvolt-Strahlentherapie unterzogen. Die mit dieser Methode erzielten, ausgesprochenen günstigen Ergebnisse lassen keinen Zweifel an der Richtigkeit dieses Konzeptes (EARLE et al. 1973, SLAWSON 1978).
b. Die nicht-seminomatösen KZT behandelt man nach der inguinalen Semikastration mit verschiedenen Polychemotherapieschemata, z.B. einer Dreierkombination aus Cis-Platin, Vinblastin und Bleomycin (EINHORN und DONOHUE 1977); auch hier liegen gute Resultate vor.

Gerade so grundsätzlich ermutigende, aber divergierende Therapiemöglichkeiten erfordern eine genaue pathohistologische Diagnosestellung.

Tab. 1: Gegenüberstellung der Klassifikationen der malignen testikulären Keimzellgeschwülste nach dem britischen Testicular Tumor Panel (TTP) und nach der World Health Organisation (WHO).

| TTP<br>PUGH, R.C.B., 1976 | WHO<br>MOSTOFI, F.K.<br>SOBIN, L.H., 1977 |
|---|---|
| I. Seminomatöse Keimzelltumoren | |
| Seminom | Seminom |
| a. "typisch" | a. "typisch" |
| b. spermatozytär | b. spermatozytär |
| c. atypisch | c. anaplastisch |
| (d.mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen[1]) | (d.mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen) |
| II. Nicht-Seminomatöse Keimzelltumoren | |
| Teratom, differenziert = TD | Teratom |
| a. reif | a. reif |
| b. unreif | b. unreif |
| Malignes Teratom Intermediärtyp = MTI | Teratom plus Embryonales Karzinom oder Teratom mit maligner Transformation |
| Malignes Teratom undifferenziert = MTU[3] | Embryonales Karzinom<br>Polyembryom[2] |
| Malignes Teratom trophoblastischer Typ = MTT | Chorionkarzinom<br>a. mit<br>b. ohne Teratom oder andere Typen |
| | Dottersack-Tumor[3] |

Tab. 1 Fortsetzung:

III. Kombinations-Tumoren

| | |
|---|---|
| Seminom plus | Seminom plus |
| Malignes Teratom | Teratom, Teratom plus |
| (TD,MTI,MTU,MTT) | Embryonales Karzinom, |
| | Embryonales Karzinom, |
| | Chorionkarzinom, |
| | Dottersacktumor |

Anmerkungen zu Tab. 1:

1. Das Seminom mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen ist bisher noch nicht als eigene Entität definiert. Der Begriff findet jedoch in dieser Arbeit Verwendung und ist der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.

2. Unter Polyembryom wird in der amerikanischen Nomenklatur ein Tumor verstanden, der völlig aus "Embryoid-Körpern" aufgebaut ist. Dies sind Strukturen, die einem Embryo der zweiten Gestationswoche ähneln. In Reinform sehr selten, kommen Embryoid-Körper in Teratomen oder Embryonalen Karzinomen manchmal vor.

3. Der Begriff des Dottersacktumors wurde von TEILUM (1959) durch histologischen Vergleich mit bestimmten Ovarialtumoren und tierischem Untersuchungsgut geprägt. TEILUM entdeckte in seinen morphologischen Untersuchungen eine weitgehnde Ähnlichkeit dieser Geschwülste mit Strukturen in der Rattenplazenta. Er folgerte daraus, daß es sich bei diesen Tumoren um extraembryonales Gewebe handelt, welches von pluripotenten Zellen gebildet wird. WOODTLI und HEDINGER (1974) sehen in dieser Tumorform eher eine Variante des Embryonalen Karzinoms.
In der reinen Ausprägung kommen Dottersacktumoren typischerweise in der Kindheit vor. Dottersackstrukturen sind jedoch ein häufiger Bestandteil von Teratomen bei Erwachsenen.
Der Dottersacktumor wird im TTP nicht als eigene Teratomform aufgeführt, sondern unter den undifferenzierten malignen Teratomen (MTU) subsummiert.

2.1.2. Das Problem der Keimzelltumor-Klassifikation

KZT machen ca. 90% der testikulären Geschwülste aus (LÖHRS 1982).
Die divergierenden Vorstellungen über die Histogenese führten zu zwei unterschiedlichen Klassifizierungssystemen, nämlich der amerikanischen WHO-Klassifikation und dem britischen TTP-Schema. (Gegenüberstellung siehe Tab. 1).
Hauptunterschied ist die kontroverse Auffassung des Begriffs "Teratom", während das "Seminom" als Terminus unumstritten ist.

2.1.2.1. Die WHO-Nomenklatur

(MOSTOFI und SOBIN 1977)
Die WHO-Nomenklatur fordert für die Bezeichnung "Teratom" das Vorliegen von Tumoranteilen aus mehr als einem Keimblatt.
Sind solche differenzierten Strukturen nicht erkennbar, so spricht man vom "Embryonalen Karzinom".
Bei gleichzeitigem Auftreten von differenzierten, undifferenzierten oder sonstigen (Trophoblast,Dottersack) Zellformationen in einem NSKZT, wird dieser als Kombinationsgeschwulst aufgefaßt, ähnlich den Kombinationstumoren aus seminomatösen und nicht-seminomatösen Geweben.
Terminologisch bringt man dies durch separates, additives Aufführen der Einzelkomponenten zum Ausdruck, wie z.B. Teratom plus Embryonales Karzinom plus Dottersacktumor.
Zur exakten pathohistologischen Erfassung eines Gesamttumors gut geeignet, fehlt dieser Nomenklatur die im klinischen Alltag nötige Prägnanz.

2.1.2.2. Die TTP-Nomenklatur

(PUGH, in Pugh 1976, S.144)
Einfacher und griffiger stellt sich die britische Klassifikation dar. Die verschiedenen Tumorbilder

werden als unterschiedlich hoch differenzierte Erscheinungsformen von Teratomen gesehen und als solche vier Gruppen zugeteilt. Die Zuordnung erfolgt dabei - mit Ausnahme des Malignen Teratoms vom trophoblastischen Typ (MTT) - entsprechend den am höchsten differenzierten Arealen, unabhängig von deren Anteil an der Gesamttumormasse. Sind jedoch die histologischen Kriterien des MTT erfüllt, so wird - wiederum unabhängig von der Größe der Veränderung oder der Beschaffenheit des Resttumors - die Diagnose gestellt.

Per definitionem weicht das britische "Maligne Teratom vom trophoblastischen Typ (MTT)" streng genommen vom amerikanischen "Chorionkarzinom" ab. Zur Diagnosestellung gemäß dem TTP müssen vorliegen:
1. Ein erkennbarer Synzytiotrophoblast
2. Ein abgrenzbarer Zytotrophoblast
3. Ein zottenartiges Wachstumsmuster.

Die WHO-Einteilung beharrt dagegen nicht auf den Zotten. In der Praxis wird heute jedoch auch von den meisten Anhängern der britischen TTP-Einteilung auf das strenge Kriterium der Zottenbildung verzichtet. Reine Chorionkarzinome sind äußerst seltene Tumoren, nach MOSTOFI und PRICE (1973) machen sie nur 0,3% aller Hodentumoren aus.
Im Alltag gewährleistet die gleichzeitige Anwendung beider Klassifikationen den größtmöglichen Informationsgehalt, da "...Die britische Nomenklatur dem Kliniker eine einfache und vernünftige Gruppierung der Hodengeschwülste bietet, die amerikanische Nomenklatur ihm dagegen einen Katalog der Einzelformen gibt." (HEDINGER 1977).
Auch in der vorliegenden Arbeit werden beide Nomenklaturen nebeneinander berücksichtigt.

2.1.2.3. Weitere testikuläre Geschwülste

a. Paratestikuläre Tumoren

Gutartige, vom Nebenhoden ausgehende Adenomatoidtumoren, benigne Weichteiltumoren und maligne Weichteilsarkome, wie Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom, Fibrosarkom und Liposarkom, fallen unter diesen Begriff, insgesamt machen sie ca. 7% aller Tumoren des Skrotalinhaltes aus (PUGH, in Pugh 1976).

b. Keimstrang-/Stromatumoren:

Diese Tumoren sind von den Keimzellneoplasien abzugrenzende Geschwülste, die ihren Ausgang von den Keimsträngen und dem pluripotenten Stroma nehmen: die Sertoli-Zell-Tumoren und Leydig-Zelltumoren (je ca. 1,5% der Hodengeschwülste) (PUGH, in Pugh 1976). Sie sind zu 90% gutartig.

Daneben kommen maligne Lymphome in 5-7% der Fälle (PUGH, in Pugh 1976) und in dysgenetischen Gonaden sehr selten das Gonadoblastom vor.

## 2.2. Die Antigene

### 2.2.1. Das Tissue Polypeptide Antigen (TPA)

#### 2.2.1.1. Der hypothetische Ansatz

Ausganspunkt der Entdeckung des TPA war die Hypothese Björklund's (1956), es müsse spezifische antigene Determinanten geben, die von allen Tumorzellen exprimiert werden und somit Kennzeichen maligner Gewebe, unabhängig von ihrem Entstehungsorgan sind. Um solche Antigene zu isolieren, immunisierte er ein Pferd mit einem Gemisch aus 56 menschlichen Tumoren (BJÖRKLUND B. 1956, BJÖRKLUND B. und BJÖRKLUND V. 1957). Das Ergebnis war ein zytotoxischer Antikörper, der scheinbar ausschließlich mit Karzinomzellen reagierte. Das entsprechende Antigen nannte Björklund Tissue Polypeptide Antigen (TPA).

#### 2.1.2. Biochemie des TPA

Biochemisch stellt sich das TPA als nichtlösliches polydisperses Protein dar, das sich erst mittels Natrium-Dodecylsulfat in Einzelkomponenten mit Molekulargewichten von 20.000 bis 45.000 Daltons zerlegen läßt, die jedoch Polymerisationstendenz behalten (BJÖRKLUND B. 1980).

Die wichtigste Fraktion ist das TPA-B 1, ein nichtverzweigtkettiges, filamentäres Einzelstrangprotein mit einem Molekulargewicht von 43.000 Daltons (LÜNING et al. 1980). Die Sekundärstruktur ist überwiegend alpha-helikal konfiguriert (WIKLUND u. LÜNING 1982). Es enthält keinen meßbaren Zucker- oder Lipidanteil, auch sonstige prosthetische Gruppen fehlen.

Das elektrophoretische Verhalten ähnelt dem der Beta- 2-Globuline, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,5, die Sedimentationskonstante bei 4,5 s.

Die Aminosäurensequenz der antigenen Derminante ist bekannt und konnte synthetisch hergestellt werden (REDELIUS 1980): Arginin wurde als der für die Antigenität entscheidende Bestandteil identifiziert. Die chemische Blockierung dieser Aminosäure beseitigt völlig die antigenen Eigenschaften, ihre Deblockierung stellt sie wieder her. Ebenfalls auffällig ist die symmetrische Anordnung der Ladungen, der an den Argininrest angrenzenden Aminosäuren. Cystin kommt in der Sequenz nicht vor.

2.2.1.3. Die Tumorassoziation

Der Optimismus einen spezifischen Parameter für das Vorliegen eines bösartigen Tumors in die Klinik einführen zu können, erwies sich jedoch als unhaltbar: bereits BJÖRKLUND selbst stellte hohe TPA-Werte in normalem Plazentagewebe fest (BJÖRKLUND B. et al.1973). Weitere Untersuchungen zeigten das Vorliegen von TPA in fetalem Gewebe, Mekonium (BJÖRKLUND B., 1979) und sogar bei anderen Wirbeltierarten, bis hin zu bestimmten Fischspezies (BJÖRKLUND B. et al. 1976).
Der Charakter eines tumor-assoziierten Antigens ließ sich jedoch serologisch und immunhistochemisch bestätigen. So findet man das TPA klinisch-serologisch in einem sehr breiten Spektrum menschlicher Organtumoren:
Patienten mit Karzinomen des Uterus (Corpus und Cervix), des Kopfes und des Nackens, der Brust, der Niere, des Hodens, der Blase und der Prostata, ja sogar Sarkompatienten wiesen teils signifikant erhöhte TPA-Serum- oder Urinwerte auf (BJÖRKLUND B. et al. 1973; MENENDEZ-BOTET et al. 1978, SKRYTEN et al. 1981), teils waren die Ergebnisse widersprüchlich. Eine Korrelation zwischen Serologie und histologischer Karzinom-Klassifikation und Graduierung fehlt in allen Studien.

Darüberhinaus wiesen SKRYTEN und Mitarbeiter (1981) und andere Autoren (SCHLEGEL G. et al. 1981; LÜTHGENS u. SCHLEGEL 1981) in klinischen Studien eine positive Korrelation zwischen Höhe des TPA-Serumspiegels und klinisch-proliferativer Tumoraktivität bzw. Tumorreaktivität in der postoperativen Verlaufskontrolle nach.
Auch stieg die Mortalität mit zunehmenden TPA-Werten signifikant an (EKLUND 1979).

2.2.1.4. Zellbiologisches Vorkommen

Neueste Forschungen Björklunds über die zellbiologische Lokalisation und den Zeitpunkt der TPA-Synthese im Zellzyklus synchron wachsender HeLa-Gewebskulturzellen vermochten die klinischen Befunde experimentell zu untermauern (BJÖRKLUND B. und BJÖRKLUND V., 1983).
Demzufolge wird das TPA während der S-Phase im perinukleären Raum synthetisiert.

Es aggregiert dort zu einem dreidimensionalen Netzwerk, das durch das Zytoplasma hindurch in Richtung Zellmembran "vorwächst", wo es in Form einer dünnen Schicht kondensiert. Die Dichte dieser Schicht nimmt während des prämitotischen Abrundungsvorganges und der Zellteilung zu.
Nach Abschluß der Mitose zerfällt die Schicht in Fragmente, die in die perizelluläre Flüssigkeit abgegeben werden, dissoziieren und in Lösung gehen. Die beiden Tochterzellen enthalten dann bis zum erneuten Beginn der S-Phase kein nachweisbares TPA mehr.

Aus diesem Vorgang ergeben sich Anhaltspunkte für die Zugehörigkeit des TPA zur Gruppe der Moleküle des Zytoskeletts.

2.2.1.5. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett, dem in jüngster Zeit zunehmend Beachtung geschenkt wird, setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Proteinstrukturen zusammen (s.Tab.2., nach MOLL et al. 1982). Als Hauptgruppen lassen sich Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente differenzieren.

Ihnen allen kommt für die Aufrechterhaltung der Struktur und für dynamische Prozesse im Zellzyklus entscheidende Bedeutung zu.

Die Mikrofilamente sind z.B. beteiligt an Zellgestalt und Beweglichkeit (CLARKE und SPUDICH, 1977), an der Veränderung der Zellmembranproteine (ASH et al. 1977), an den Bewegungsabläufen der Chromosomen und zellulärer Prozesse (FUJIWARA und POLLARD 1976), an der Mitose (SCHROEDER 1973) und möglicherweise an der Regulation der Proliferation (EDELMAN 1976).

Parallelen zu den oben beschriebenen Eigenschaften des TPA drängen sich auf.

Von den biochemischen Daten her wäre das TPA aber der Klasse der Intermediärfilamente zuzuordnen, über deren Funktionen bisher noch wenig bekannt ist.

Die Bezeichnung "intermediär" bezieht sich auf Molekulargewicht und Größe (7-11 nm), wodurch sie sich von den kleineren Mikrofilamenten und den größeren Mikrotubuli unterscheiden.

Intermediärfilamente kommen zwar ubiquitär in Zellen und Geweben vor, doch gelang es verschiedene Untergruppen voneinander abzugrenzen (MOLL et al. 1982). Für bestimmte Gewebe scheinen feste Kombinationen solcher Untergruppen typisch zu sein.

So kennzeichnet das Vorliegen von Intermediärfilamenten des Zytokeratintyps epitheliale Zellen, des Vimentintyps mesenchymale Zellen und des Desmintyps, Skelett- und Herzmuskulatur, sowie einige Zellen des glatten Muskelgewebes. Bei der Zelltransformation und

Tab. 2: Das Zytoskelett (MOLL et al. 1982):

A. Mikrofilamente.
(aktinhaltig)

B. Mikrotubuli.
(tubulinhaltig)

C. Intermediärfilamente.

| | | |
|---|---|---|
| 1. Zytokeratine | Epitheliale Zellen | Biochemisch und immunologisch heterogene Gruppe: Mind. 19 verschiedene Typen, die spezifische Verteilungsmuster entsprechend dem Epitheltyp aufweisen. |
| 2. Vimentin | Mesenchymale Zellen<br>Astrozyten<br>Sertoli-Zellen<br>Glatte Gefäßmuskelzellen<br>Zellen in der Gewebekultur | Jeweils nur ein spezifischer Proteinsubtyp. |
| 3. Desmin | Muskelzellen | |
| 4. Neurofilamente | Nervenzellen | |
| 5. Gliafilamente | Astrozyten | |

Tumorentstehung wird diese Zellspezifität großenteils eingehalten (MOLL et al. 1982), die Nutzungsmöglichkeiten für Histodiagnostik und -klassifikation erscheinen evident.
Aufgrund der in Tab. 2 aufgeführten Heterogenität der Zytokeratinuntergruppe erscheint sogar eine Unterscheidung verschiedener Epithelarten anhand des spezifischen Zytokeratinmusters möglich (MOLL et al. 1982).

2.2.1.6. TPA-Lokalisation in normalen Geweben des Menschen

Die umfassende Arbeit von NATHRATH und Mitarbeitern (1983) über immunhistochemische Verteilung und Vorkommen des TPA in Normalgeweben des Menschen zeigt, daß es in fast allen drüsig aufgebauten Epithelien, den prismatischen Epithelien die Hohlorgane auskleiden und in nicht-verhornendem Plattenepithel nachzuweisen ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Schnittstufen zweier Embryonen (ca. 8. und 12. Gestationswoche) TPA in drüsig-konfigurierten Epithelien dargestellt.
Unter Berücksichtigung des oben Gesagten, könnte man also das TPA als Intermediärfilament der Zytokeratingruppe mit charakteristischem Auftreten in Drüsenepithelien bezeichnen. Zum endgültigen Beweis fehlen jedoch noch die immunfluoreszenzmikroskopischen und gelchemischen Arbeiten.
Das Verteilungsmuster unterscheidet sich deutlich von dem anderer epithelialer Antigene, wie dem "Epithelial Membrane Antigen" (SLOANE UND ORMEROD 1981), oder den Blutgruppenantigenen (SZULMAN 1964), ähnelt aber in seiner Lokalisation dem "Luminal Epithelial Antigen" (NATHRATH et al. 1982 a, NATHRATH et al. 1982 b).
Bezüglich der Keratingruppe im engeren Sinn, weicht

TPA von dem von SCHLEGEL und Mitarbeitern (1980) entdeckten Keratin ab und zeigt trotz der oben dargelegten chemischen Ähnlichkeit mit Zytokeratinen niederen Molekulargewichtes und sauren Isoelektrischen Punktes (MOLL et al., 1982) keine immunhistochemische Übereinstimmung mit bisher ausgetesteten Proteinen dieser Gruppe (DEBUS et al. 1982, GIGI et al. 1982).

2.2.1.7. TPA-Lokalisation in Malignomgeweben

Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über erhöhte TPA-Werte im Serum/Urin (s.o.) von Tumorpatienten fehlen weitgehend immunhistochemische Studien. V.Björklunds Bericht über TPA-Verteilung in Mammakarzinomen (BJÖRKLUND V. et al., 1982) zeigt, daß sich auch in atypischen und malignen Zellen TPA immunhistologisch darstellen läßt. Auch hier färben sich typischerweise drüsige Epithelien und Adenokarzinomstrukturen an.

2.2.2. Die Keratinfraktion LP 34

Geradezu komplementär zum TPA verhält sich in ihrer histologischen Lokalisation die epidermale Keratinfraktion LP 34 bei formalinfixiertem Material (NATHRATH, pers. Mitt.).
U.a. deswegen wurde sie für die vorliegende Arbeit ausgewählt.
LP 34 findet sich in Normalgeweben praktisch ausschließlich in den apikalen Anteilen von verhornendem Plattenepithel.
Histochemisch analoge Lokalisation weisen die Cytokeratine 4-6 nach MOLL und Mitarbeitern (1982) auf, die chemisch als relativ große und leicht basische Polypeptide beschrieben werden.

## 3. MATERIAL

Untersucht wurden Präparate von insgesamt 51 Patienten:
Davon 44 mit Keimzelltumoren (KZT) des Hodens.
39 Primärtumoren, ein Kollektiv mit 11 Seminomen, 8 Kombinationstumoren mit seminomatösem und nicht-seminomatösem Anteil und 20 rein nicht-seminomatösen KZT (s. Tab. 3).

Extragonadal lokalisiert sind
a) 12 Metastasen von KZT (5 mit eigener Fallnummer gerechnet, da kein Primärtumor vorhanden war, 7 sind zusammen mit den Primärtumoren aufgeführt). Bei 4 Patienten konnten der Primärtumor vor und die Metastasen nach Polychemotherapie untersucht werden. In zwei Fällen standen nur noch die Metastasen nach Zytostase zur Verfügung.

b) ein Teratom am Hals und ein Steißbeinteratom.

Weiterhin gehören zum Untersuchungsgut 2 Tumoren des Gonadenstromas (Leydigzelltumoren) und drei paratestikuläre Neoplasien (ein Adenomatoidtumor und zwei Juvenile Rhabdomyosarkome).
Als Referenz- und Vergleichspräparate dienten zwei Embryonen unterschiedlichen Gestationsalters, ein Endometriumabradat mit Plazenta-Anteilen und einige Fälle benigner und maligner Erkrankungen des lymphatischen Systems.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme bei
-Seminomen: 33,2 Jahre (23-43 J.)
-Komb.-Tumoren: 34,5 Jahre (27-44 J.)
-NSKZT: 28,6 Jahre (20-47 J.).

Das gesamte Untersuchungsmaterial ist Tab. 4 zu entnehmen. Es entstammt dem Bestand des Pathologischen Institutes der Universität München aus dem Zeitraum zwischen 1977 und 1982.

Teilweise wurden Fälle bereits unter anderer Fragestellung ausgewertet, worauf in dieser Arbeit bei Vergleichen mit HCG- und AFP-Präparaten zurückgegriffen wird (LÖHRS 1982, LÖHRS et al. 1980, NATHRATH et al. 1982).

Ausgewählt wurden Fälle, die vom histologischen Bild oder vom Verlauf her interessant erschienen, doch wurde darauf geachtet, das ganze Spektrum der Hodentumoren und besonders der KZT zu erfassen.

Tab.3:
Tissue Polypeptide Antigen (TPA) und Keratin LP 34 in Keimzelltumoren des Hodens:

n = 46
(+ 2 Leydigzelltumoren )
(+ 3 paratest. Tumoren )

| SEMINOME | KOMB.TUMOREN (Seminom + NSKZT) | NICHT-SEMINOMAT. KEIMZELLTU.(NSKZT) | EXTRAGONADAL |
|---|---|---|---|
| | 1 TD | 1 TD | (8 TD in Metastasen) |
| | 3 MTI | 8 MTI | (2 MTI in Metastasen) |
| 11 | Se. + 3 MTU | 6 MTU | (2 MTU in Metastasen) |
| | 1 MTT | 5 MTT | |
| | | | 1 TD am Hals |
| | | | 1 MTI am Steißbein |
| n = 11 | n = 8 | n = 20 | n = 5 Meta.ohne Prim. |
| | | | (n = 7 Meta.mit Prim.) |
| | | | n = 2 Extragonadale |

Tab. 4: Keimzelltumoren

| Fallnr. | Pat. | Alter | Primärtu. | TTP-Diagn. | WHO-Diagn. | RZ | Metastase | Chemoth. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | H.G. | 21 J. | Hoden | TD | Teratom | Ø | Ø | Ø |
| 2 | M.H. | 30 J. | Hoden | TD + Sem. | Teratom + Sem. | Ø | LK:TD | Ø |
| 3 | N.W. | 1 Mo. | Hals | TD | Teratom | Ø | Ø | Ø |
| 4 | H.K. | 33 J. | (Hoden) | (MTI) | (Teratom + Embr.Ca) | Ø | Lu:TD | nach |
| 5 | R.F. | 33 J. | (Hoden) | (MTI + Sem.) | (Teratom + Embr.Ca + Sem.) | Ø | LK:TD | Ø |
| 6 | P.N. | 30 J. | (Hoden) | (MTU) | (Embr.Ca) | Ø | LK:TD | Ø (1) |
| 7 | R.P. | 32 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | + | LK:MTU<br>LK:TD | vor<br>nach |
| 8 | W.F. | 22 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | Ø | Ø | Ø |
| 9 | G.S. | 24 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | Ø | LK:MTI | Ø |
| 10 | R.H. | 33 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | + | LK:TD | nach |
| 11 | G.R. | 20 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |
| 12 | M.T. | 29 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |
| 13 | H.V. | 33 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |
| 14 | J.L. | 32 J. | Hoden | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | + | LK:TD | nach |
| 15 | H.G. | 39 J. | Hoden | MTI + Sem. | Teratom + Embr.Ca + Sem. | Ø | Ø | Ø |
| 16 | R.G. | 28 J. | Hoden | MTI + Sem. | Teratom + Embr.Ca + Sem. | Ø | Lu:TD | nach |
| 17 | F.H. | 39 J. | Hoden | MTI + Sem. | Teratom + Embr.Ca + Ds. + Sem. | Ø | Ø | Ø |
| 18 | A.H. | 7 Mo. | Steißb. | MTI | Teratom + Embr.Ca + Ds. | Ø | Ø | Ø |
| 19 | H.R. | 28 J. | (Hoden) | (MTI + Sem.) | (Teratom + Embr.Ca + Sem.) | Ø | LK:MTI | nach |
| 20 | J.E. | 29 J. | Hoden | MTU | Embr.Ca | + | Ø | Ø |
| 21 | W.L. | 37 J. | Hoden | MTU | Embr.Ca | + | Ø | Ø |
| 22 | R.P. | 29 J. | Hoden | MTU | Embr.Ca | + | Ø | Ø |
| 23 | M.G. | 31 J. | Hoden | MTU | Embr.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |
| 24 | K.B. | 36 J. | Hoden | MTU | Embr.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |

Tab. 4 Fortsetung:

| Fallnr. | Pat. | Alter | Primärtu. | TTP-Diagn. | WHO-Diagn. | RZ | Metastase | Chemoth. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25 | J.G. | 28 J. | Hoden | MTU | Embr.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |
| 26 | M.B. | 27 J. | Hoden | MTU + Sem. | Embr.Ca + Ds.+ Sem. in situ | Ø | Ø | Ø |
| 27 | W.M. | 44 J. | Hoden | MTU + Sem. | Embr.Ca + Sem. | + | Ø | Ø |
| 28 | K.O. | 39 J. | Hoden | MTU + Sem. | Embr.Ca + Ds.+ SEm. | Ø | Ø | Ø |
| 29 | H.T. | 47 J. | Hoden | (MTI) (2) | (Teratom + Embr.Ca) | Ø | LK:MTU+Ds. | Ø |
| 30 | P.W. | 22 J. | Hoden | MTT | Teratom + Embr.Ca+Cho.Ca+Ds. | + | Ø | Ø |
| 31 | U.H. | 26 J. | Hoden | MTT | Teratom + Embr.Ca+Cho.Ca+Ds. | + | Ø | Ø |
| 32 | G.P. | 36 J. | Hoden | MTT | Embr.Ca + Cho.Ca | + | Ø | Ø |
| 33 | H.S. | 28 J. | Hoden | MTT | Embr.Ca + Cho.Ca | + | Ø | Ø |
| 34 | H.N. | 24 J. | Hoden | MTT | Embr.Ca + Cho.Ca + Ds. | + | Ø | Ø |
| 35 | H.M. | 30 J. | Hoden | MTT + Sem. | Embr.Ca + Cho.Ca + Ds.+ Sem. | + | Ø | Ø |
| 36 | G.K. | 26 J. | Hoden | Seminom | Seminom | Ø | Ø | Ø |
| 37 | A.S. | 37 J. | Hoden | Seminom | Seminom | Ø | Ø | Ø |
| 38 | U.G. | 30 J. | Hoden | Seminom | Seminom | Ø | Ø | Ø |
| 39 | M.E. | 38 J. | Hoden | Seminom | Seminom | Ø | Ø | Ø |
| 40 | F.H. | 43 J. | Hoden | Seminom | Seminom | Ø | Ø | Ø |
| 41 | F.K. | 39 J. | Hoden | Seminom | Seminom | + | Ø | Ø |
| 42 | J.S. | 23 J. | Hoden | Seminom | Seminom | + | Ø | Ø |
| 43 | L.S. | 27 J. | Hoden | Seminom | Seminom | + | Ø | Ø |
| 44 | R.P. | 39 J. | Hoden | Seminom | Seminom,anaplastisch | Ø | Ø | Ø |
| 45 | F.D. | 24 J. | Hoden | Seminom | Seminom,anaplastisch | Ø | Ø | Ø |
| 46 | N.F. | 39 J. | Hoden | Seminom | Seminom,anaplastisch | Ø | Ø | Ø |

Anmerkungen: (1) Ohne Chemotherapie spontaner Typwechsel der Metastasen.
(2) Dem P.war 1958 bei einer Appendektomie eine "teratoide Geschwulst" aus dem Bauchraum und zusätzlich der rechte Hoden entfernt worden. Nach fast 14 Jahren erneute Laparatomie wegen eines "Bauchtumors": LK-Metastasen histolog.MTU.

Legende zu Tab. 4:

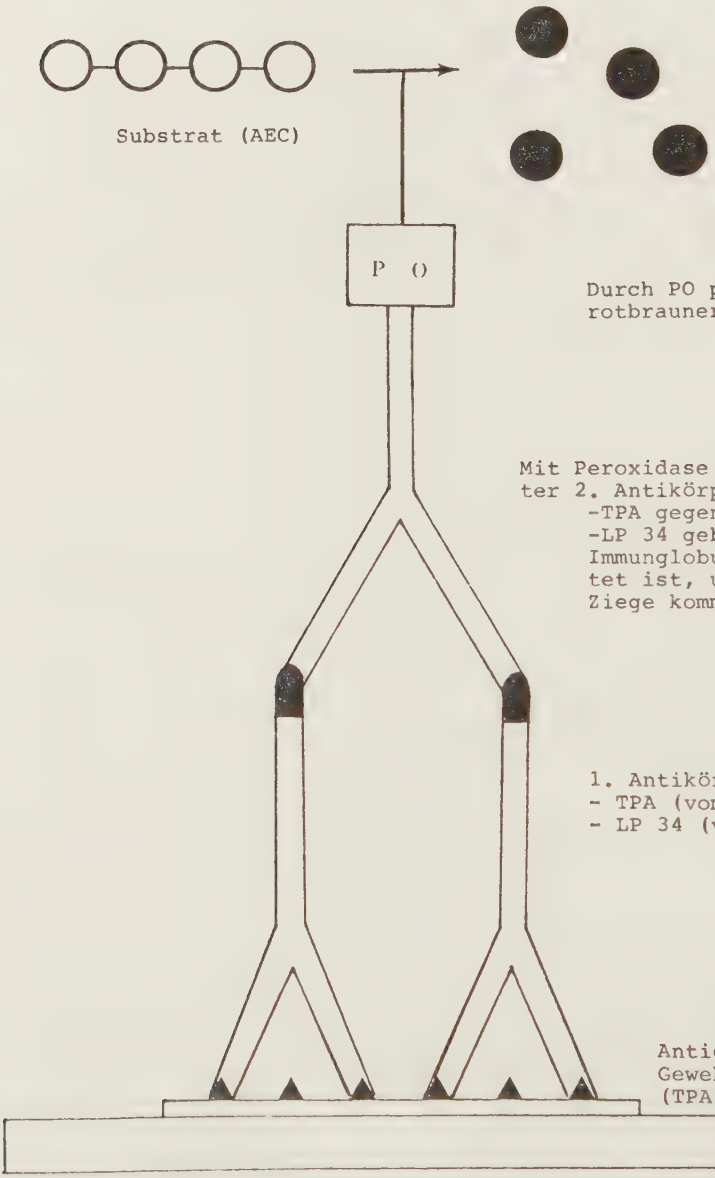
| | |
|---|---|
| TTP-Diagn. | = Nomenklatur/Klassifikation nach dem Testicular Tumor Panel |
| WHO-Diag. | = Nomenklatur/Klassifikation nach der World Health Organisation |
| RZ | = Vorhandensein synzytiotrophoblastischer Riesenzellen |
| Chemoth. | = Polychemotherapie |
| Ø | = Negativer Befund |
| + | = Positiver Befund |
| ( ) | = Sichere Diagnose vorhanden, aber nicht im Rahmen der Thematik untersucht. |
| TD | = Differenziertes Teratom |
| MTI | = Malignes Teratom Intermediärtyp |
| MTU | = Malignes Teratom undifferenz.Typ |
| MTT | = Malignes Teratom trophoblast.Typ |
| Sem. | = Seminom |
| Ds. | = Dottersacktumor |
| Embr.Ca. | = Embryonales Karzinom |
| Cho.Ca. | = Chorionkarzinom |
| LK | = Lymphknoten |
| Lu | = Lunge |

Bei fehlendem Primärtumor wurden die Metastasen unter dem in ihnen vorliegenden Tumortyp klassifiziert.

Tab. 5: Weiteres Untersuchungsmaterial

| Fallnr. | Pat. | Alter | Primärtumor | Diagnose |
|---|---|---|---|---|
| 47 | L.H. | 28 J. | Hoden | Leydigzelltumor |
| 48 | H.B. | 33 J. | Hoden | Leydigzelltumor |
| 49 | K.P. | 40 J. | Nebenhoden | Adenomatoidtumor |
| 50 | F.S. | 4 J. | Samenstrang | Juv.Rhabdomyosarkom |
| 51 | O.P. | ? | Samenstrang | Juv.Rhabdomyosarkom |

Abb. 2: Die Indirekte Immunperoxidase-Methode



## 4. METHODE

### 4.1. Die Indirekte Immunperoxidase-Methode

Zum Nachweis von TPA und Keratin wurde eine im Pathologischen Institut der Universität München modifizierte und an zahlreichen Studien erprobte "Indirekte Immuno-Peroxidase-Methode für Paraffinschnitte" angewandt (NATHRATH et al. 1982).

#### 4.1.1. Herstellung der Schnitte

Ca. 3-6 µm dicke Paraffinschnitte werden auf Serum-Glycerin bestrichene Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 55°C getrocknet, um ein gutes Anhaften der Schnitte zu gewährleisten.
Pro Block und Antigen werden ein Kontroll- und zwei Testschnitte benötigt.

#### 4.1.2. Entparaffinierung

Die Präparate werden über Xylol (4 x 5 Min.), absoluten Alkohol (3 x 5 Min.), 96%igen Alkohol (2 x 5 Min.), 70%igen Alkohol (2 x 5 Min) und Aqua dest. (3 x 2 Min.) entparaffiniert.

#### 4.1.3. Protease-Vorbehandlung

Durch das Einwirken einer unspezifischen Protease können "maskierte Antigene" im Gewebe sichtbar gemacht werden (TAKAMIYA et al. 1978); als Nebeneffekt nimmt in den meisten Fällen auch die Hintergrundfärbung (s. 4.1.4.) ab (NATHRATH und MEISTER 1982).
In der feuchten Kammer läßt man bei Zimmertemperatur die Schnitte zunächst für 15 Min. mit Protease von Bac.amyloliquefaciens (Fa.Sigma) 0,1%ig in PBS (Phosphate buffered saline, s. 4.1.4.) inkubieren (WITTING 1977), anschließend für 90 Min. im Kühlschrank bei 4°C in vorgekühlter PBS-Lösung ruhen.

4.1.4. Unspezifische Vorbehandlung

a. Ausschalten der endogenen Gewebs-Peroxidase (PO) (HEYDERMANN und NEVILLE 1977)

5 Min. frisches 7,5%iges Wasserstoffperoxid (A.dest. verdünntes 30%iges $H_2O_2$ der Fa. Merck) beseitigt v.a. die im Hämatin vorhandene PO-Aktivität. Danach wird 5 Min. in fließendem Leitungswasser gespült.

Nach 5 Min. 2,29 %iger Perjodsäure (entspr. 0,1 M in A.dest. gelöstem Perjodat der Fa. Merck, gelagert bei 4°C) ist auch die endotheliale PO unterdrückt. Bei diesem Schritt fallen Stickaldehyde an, die zu einer unerwünschten Hintergrundfärbung beitragen würden. Nach erneutem 5 minütigem Spülen in Leitungswasser müssen diese Gruppen durch frisch angesetzte 0,02%ige wässrige Natriumborhydridlösung (Fa. Merck) abgesättigt werden.
Die geringe Verdünnung und eine maximale Einwirkzeit von 2 Min. sind einzuhalten, da andernfalls der in Form von Gasbläschen freiwerdende Wasserstoff das Gewebe vom Objektträger abheben würde.

3 x 5 Min. gründliches Abspülen des Na-Borhydrids in PBS.

Anmerkung:
Herstellung von 20 Litern PBS:
170 g NaCl., 24,4 g $Na_2HPO_4$ x 2 $H_2O$, 7,8 g $NaH_2PO_4$ x 1 $H_2O$ (alle Fa.Merck) A.dest. ergänzen ad 20 l und vor Gebrauch mit 1 n HCl auf pH 7,2-7,4 einstellen.

b. Reduktion der Hintergrundaktivität

Prävention einer starken Absorption der peroxidase-

markierten Antikörper durch Anwendung von Serum-Glycerin statt Eiweiß-Glycerin als Adhaesivum (s.4.1.1.) und hochgereinigter, hochspezifischer Immunsera (HEYDERMAN und NEVILLE 1977).

Absättigung noch vorhandener Bindungsstellen durch ein Nicht-Immunserum (Normalserum) derselben Tierspezies, von der der PO-markierte Antikörper stammt (BURNS 1975).
Hier: 5 Min. Normales Ziegenserum 1:10 in PBS verdünnt (Fa. Dako) in feuchter Kammer/Zimmertemperatur.

10 Min in PBS im Magnetrührer spülen.

4.1.5. Darstellen des gesuchten Antigens mit dem 1.Immunserum

Anti-TPA: Das Immunserum wurde uns von B. Björklund, Stockholm, überlassen. Es handelt sich dabei um hochgereinigte anti-TPA-Antikörper vom Kaninchen (BJÖRKLUND B. und BJÖRKLUND V., 1981).
Zwei Chargen wurden verwendet, Kreuzvergleiche an geeigneten Präparaten zeigten keinen Unterschied im Reaktionsergebnis. Die erste wurde 1:160 in PBS verdünnt, bei der zweiten können keine genauen Konzentrationsangaben gemacht werden, da ein Trispuffer/Albumingemisch mitgeliefert und die neuen Antikörper vorschriftsgemäß (BJÖRKLUND B., pers.Mitt.) darin eluiert wurden.

Anti-LP 34
Es wurde von W. Franke, Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Der hochgereinigte anti-LP-34-Antikörper stammt hier von der Maus.

Mit den beschriebenen Antikörpern werden nur die Testschnitte 15 Min. in der feuchten Kammer/Zimmertempera-

tur für TPA bzw. 15 Min./37°C für LP 34 inkubiert. Man benötigt - je nach Größe des Präparates - ca. 50-100 µl pro Schnitt.

Nicht reagierende Antikörper werden durch 10 minütiges Waschen in 0,005%igem Brij 35 Detergens (Fa.Merck, verdünnt in PBS) im Magnetrührer entfernt.

4.1.6. Darstellung der Antigen-Antikörperreaktion durch das 2. Immunserum (Peroxidase (PO)-markiert)

Die Kontroll- und Testschnitte werden mit PO-gekoppeltem (NAKANE und PIERCE 1967) Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper von der Ziege (Fa. Miles) für TPA 1:500 in PBS bzw. Anti-Maus-Immunglobulin von der Ziege für LP 34 (Fa. Tago) in Endverdünnung 1:3000 in PBS überschichtet.

Überständiges Antiserum wird durch erneutes 10 min. Spülen mit Brij im Magnetrührer abgewaschen.

4.1.7. Sichtbarmachen der Immun-Sandwich-Reaktion durch Ausnützen der Enzymaktivität

Der PO wird ein frisch zubereitetes Substratgemisch angeboten.

Pro 100 ml:

10 mg 3-Amino-Ethylcarbazol (AEC,Fa.Sigma) in
6 ml Dimethylsulfoxid (DMSO,Fa.Merck) gelöst.
50 ml 0,1 M Michaelispuffer (20,6 g Natrium-Barbital ad 1000 ml A.dest., vor Gebrauch mit 1 n HCl auf pH 7,40 eingestellt).
0,5 ml 0,3% wässriges $H_2O_2$ (Fa.Merck, s.4.1.1.) ad 100 ml A.dest.

Das AEC wird unter Katalyse der Peroxidase durch das zugesetzte Wasserstoffperoxyd oxidiert, woraus am Ort

der Reaktion ein unlöslicher roter Farbstoff anfällt (GRAHAM et al. 1965, SCHAEFER und FISCHER 1968). Dieses Reaktionsprodukt ist sehr stabil und bei dunkler Lagerung bis zu zwei Jahren haltbar (SCHAEFER und FISCHER 1968).
Nachteil ist die mögliche Kanzerogenität von AEC.

Ca. 5 Min. im fließenden Leitungswasser Substratreste abspülen.

4.1.8. Gegenfärbung
In Mayer's Hämalaun in gesättigter Lithiumcarbonatlösung wird ca. 3 Min. leicht blau gegengefärbt.

Bis die Bläuung eingetreten ist, wird in fließendem Leitungswasser gespült.

4.1.9. Eindecken der Präparate
Die Präparate müssen in einem hydrophilen Medium wie Glyceringelatine eingedeckt werden, da sich sonst der Farbstoff der PO-Reaktion löst.

Die Auswertung erfolgte mit einem gängigen Lichtmikroskop der Fa.Zeiss. Zur Dokumentation wurden Präparate fotographiert.

4.2. Spezielle Anmerkungen zur Methode

In zwei Fällen fiel die Reaktion in sonst stets positiv reagierendem Gewebe schwach bzw. negativ aus. Die beiden Präparate wurden deshalb nicht in den Ergebnisteil aufgenommen.
Es handelt sich einmal um einen Dottersacktumor eines neunjährigen Jungen, dessen Orchiektomiepräparat konsiliarisch übersandt und auswärts bereits in Paraffin eingebettet worden war.
Zum anderen sollte das fünf Jahre in Formalin aufbewahrte Material von Metastasen eines Ovarialkarzinoms mit chorialen Riesenzellen und Dottersackanteilen immunhistochemisch aufgearbeitet werden.

Folgende Ursachen sind für die beschriebenen falschnegativen Resultate, wie auch für einzelne Ausfälle im vorgestellten Material denkbar:

4.2.1. Einfluß von Formalinfixierung und Proteasevorbehandlung auf die Gewebereaktivität (NATHRATH et al. 1983):
Ohne Proteasevorbehandlung fällt die spezifische Reaktion nach 24 oder 48 Stunden Formalinfixierung schwach aus, nach 72 Stunden ist keine Antigendarstellung mehr möglich.
Diesen Prozeß vermag die Proteasevorbehandlung teilweise rückgängig zu machen.
Optimale Ergebnisse kommen zustande, wenn nach 24 stündiger Formalinfixierung für 15 Minuten mit Protease bei Raumtemperatur inkubiert wird. Jahrelange Fixierung kann jedoch auch durch diesen Vorgang nicht ausgeglichen werden.
Proteaseeinwirkung über 60 Minuten andererseits, verschlechtert oder zerstört sogar die Präparate.

4.2.2. Einfluß zu hoher Temperaturen

Wassertemperaturen über 60°C des Wasserbades, das zum Glätten der Schnitte benutzt wird, oder eine Trocknungstemperatur des Wärmeofens über dieser Marke, verschlechtern das Reaktionsergebnis durch Denaturierung des Proteinanteils der Antigene.

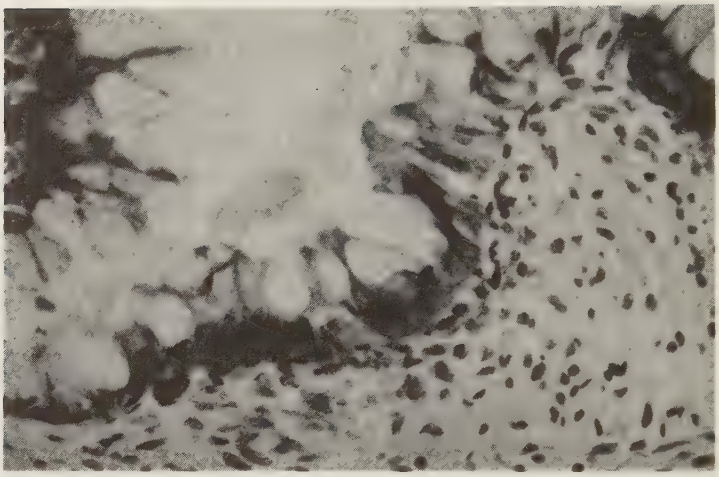


Abb. 3:
Differenziertes prismatisches Epithel mit Becherzellen, in Differenziertem Teratom (TD), TPA, Vergr.: ca. 330 fach.

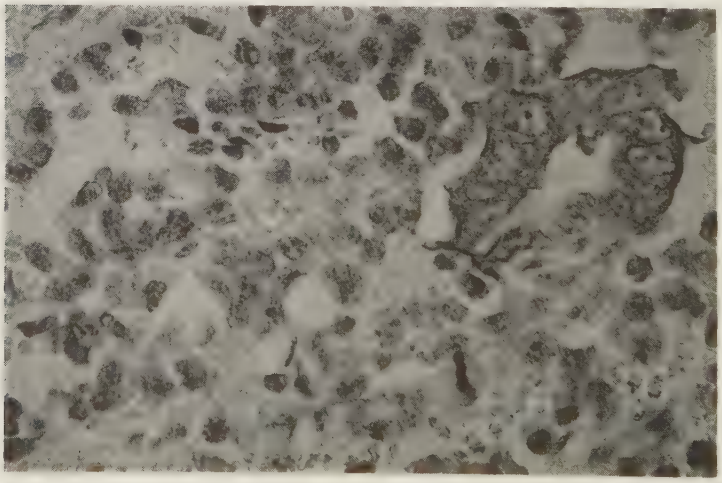


Abb. 4:
Primitive Drüse in einem Malignen Teratom vom undifferenzierten Typ (MTU). Gros des Embryonalen Karzinoms negativ, Drüsenformation positiv, TPA, Vergr. ca. 330 fach.

Abb. 5a:
Plattenepithel und Drüse in einem Differenzierten Teratom (TD), TPA, Drüse pos., Plattenepithel neg., 330 fach.

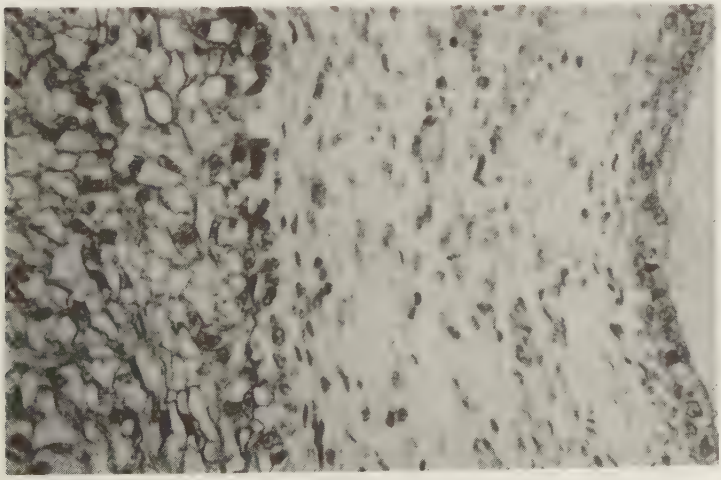


Abb. 5b:
Gleicher Bereich, Keratin, Drüse neg., Plattenepithel pos., Vergr. ca. 330 fach.

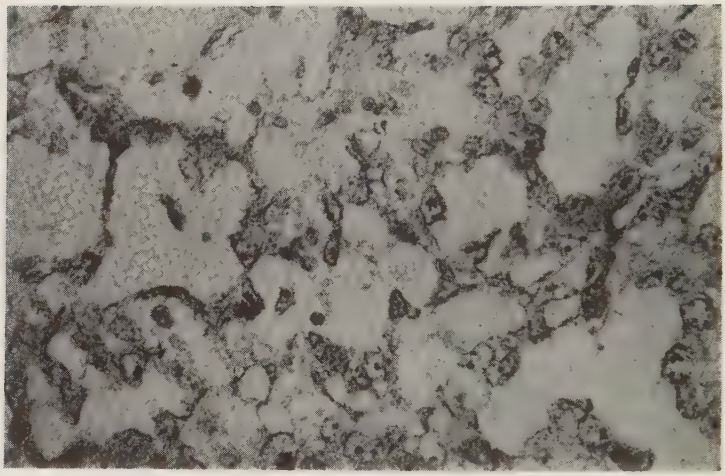


Abb. 6:
Ausschnitt aus einem Dottersacktumor in einem Malignen Teratom vom undifferenzierten Typ (MTU) mit überwiegendem Dottersackanteil plus Seminoma in situ, TPA, Vergr. ca. 330 fach.

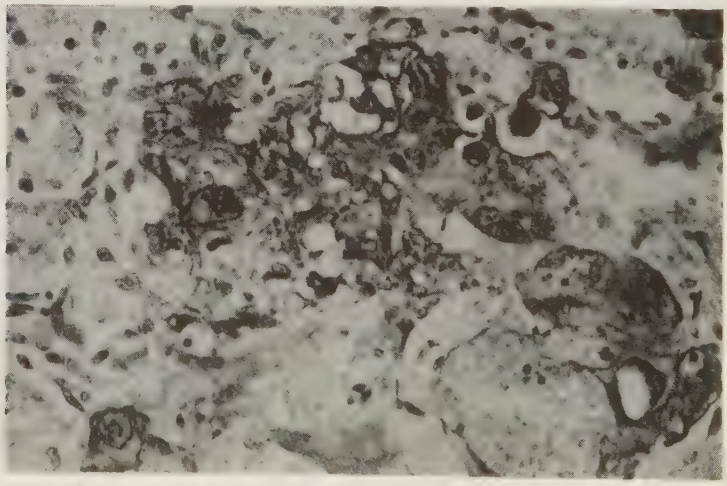


Abb. 7:
Synzytiotrophoblastärer Zellverband und Riesenzellen in einem Malignen Teratom vom trophoblastischen Typ (MTT), TPA, Vergr. ca. 330 fach.

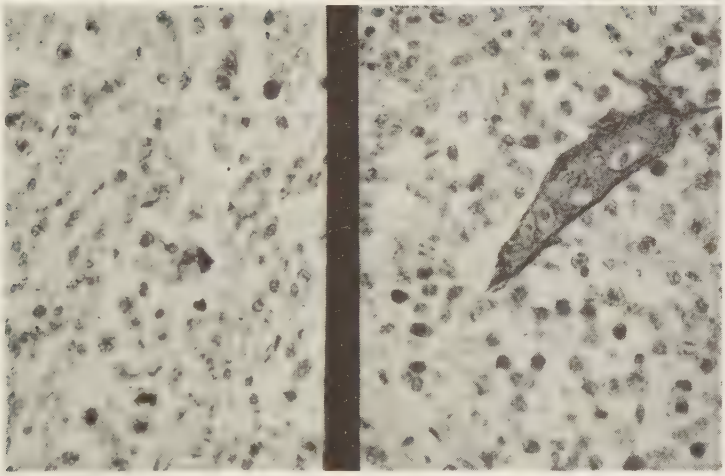


Abb. 8:
Seminom mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen, TPA, Seminom neg., Riesenzellen pos., Vergr. ca. 330 fach.

Tab. 6 : Untersuchungsmaterial "Differenzierte Teratome (TD)" bzw. "Teratome":

1. Primärtumoren: n = 3

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 1 | Hoden | TD/Teratom | 21 J. |
| 2 | Hoden | TD/Teratom + Seminom | 30 J. |
| 3 | Hals | TD/Teratom | 1 Mon. |

2. Metastasen - histologisch TD: n = 8

| Fallnr. | Organ | Diagnose des Primärtumors | Alter | Chemo-therapie |
|---|---|---|---|---|
| 2 | LK | TD/Teratom + Seminom | 30 J. | Ø |
| 4 | Lunge | (MTI/Teratom + Embr.Ca.) | 33 J. | nach Ch. |
| 5 | LK | (MTI/Teratom + Embr. Ca. + Seminom) | 33 J. | Ø |
| 6 | LK | (MTU/Embr.) Ca.) | 30 J. | Ø |
| 7 | LK | MTI/Teratom + Embr.Ca | 32 J. | nach Ch. |
| 10 | LK | MTI/Teratom + Embr.Ca. + Dotters. | 33 J. | nach Ch. |
| 14 | LK | MTI/Teratom + Embr.Ca. | 32 J. | nach Ch. |
| 16 | Lunge | MTI/Teratom + Embr. Ca. + Seminom | 28 J. | nach Ch. |

Legende vgl. Tab. 4

Tab.7:Gewebe in "Differenzierten Teratomen (TD) "/"Teratomen". (Angaben aus dem eigenen Untersuchungsgut den Zahlen Pugh's gegenübergestellt). Kriterium ist nur das grundsätzliche Vorkommen, um Ausgangszahlen für die Bewertung der Immunhistochemie zu erhalten.

| | Eigenes Material | | PUGH 1976 |
|---|---|---|---|
| | Primärtumoren n = 3 | Metastasen n = 8 | n = 28 |
| 1. EPITHELIEN: | | | |
| Plattenepithel | | | |
| - verhornend | 1 | 5 (63%) | n.u. |
| - unverhornend | 1 | 6 (75%) | n.u. |
| - metaplastisch | 2 | 6 (75%) | n.u. |
| Zylinderepithel | 3 | 8 (100%) | 100% |
| Kubisches Epithel | 3 | 8 (100%) | 100% |
| Schleim sezernierendes Epithel | 3 | 8 (100%) | 86% |
| Seromuköse Drüsen | 1 | 4 (50%) | 50% |
| Zilientragendes Epithel | n.u. | n.u. | 50% |
| Hautanhangsgebilde | n.u. | n.u. | 32% |
| Pigmentepithel | n.u. | n.u. | 21% |
| 2. BINDEGEWEBE: | | | |
| Faserbildendes BG | 3 | 8 (100%) | 100% |
| Knorpelgewebe | 2 | 2 (25%) | 75% |
| Knochengewebe | 0 | 0 (0%) | 50% |
| Fettgewebe | n.u. | n.u. | 50% |
| 3. MUSKELGEWEBE: | | | |
| Glatte Muskulatur | 2 | 8 (100%) | 100% |
| 4. NERVENGEWEBE: | | | |
| Nervenzellen | n.u. | n.u. | 50% |

n.u. = nicht untersucht/keine Angabe möglich.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Nicht-seminomatöse Keimzelltumoren und nicht-seminomatöse Anteile der Kombinationstumoren

#### 5.1.1. Differenziertes Teratom

Per definitionem kommen in einem differenzierten Teratom (TD, Teratom) keine Gewebe vor, die histologische Malignitätskriterien aufweisen.
Unreife Strukturen können vorliegen und werden entsprechend gekennzeichnet.

Das Untersuchungsmaterial, welches das histologische Bild eines differenzierten Teratoms bietet, ist Tab. 6 zu entnehmen.
In Tab. 7 ist im Vergleich zu den Ergebnissen von Pugh (PUGH u. CAMERON, in Pugh 1976, S. 222ff.) angegeben, in wievielen Fällen des Kollektivs die genannten Gewebe vorkommen.

#### 1.1.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA

1. Beim nicht-verhornenden Plattenepithel sind, entsprechend dem in Tab. 7 gezeigten grundsätzlichen Vorkommen dieses Gewebstyps, in 1 Primärtumor und in 6 Metastasen, die basalen Schichten in 1/1 der Primärtumoren und 6/6 der Metastasen TPA-positiv, d.h. die Reaktion ist in allen Präparaten positiv.

2. Das apikal und im Stratum lucidum nicht reagierende verhornende Plattenepithel (s. Abb. 5a) zeigt bei 1/1 der Primärtumoren und bei 2/5 der Metastasen (siehe Tab. 7) eine basal positive Reaktion .

3. Metaplastisches Plattenepithel weist graduelle Übergänge im Reaktionsverhalten auf. 2/2 Primärtumo-

ren und 6/6 Metastasen (s.Tab.7) reagieren zwar grundsätzlich positiv, doch in zwei Fällen (Fall 4 und 6) ist die Intensität deutlich schwächer.
Je stärker die Anlehnung an verhornendes Plattenepithel wird, desto mehr konzentriert sich das TPA-Vorkommen auf die basalen Zellagen, während im Grenzbereich zum prismatischen Epithel eine positive Reaktion bis in die apikalen Schichten hin beobachtet werden kann.

4. Kubisches und prismatisches Epithel zeigen das in sich homogenste Verteilungsmuster des Antigens: 3/3 der Primärtumoren und 8/8 der Metastasen reagieren mit immunhistologischer Anfärbung. Auffällig sind die Strukturen, die in ihrem organoiden Aufbau und dem TPA-Vorkommen von Normalgeweben nicht mehr zu unterscheiden sind (d.h.Organnachahmung, an der sich auch Bindegewebe und Muskulatur beteiligen).
Finden sich schleimbildende Becherzellen, so bleibt der Schleimpfropf stets von der positiven Reaktion ausgespart (s. Abb. 3).

5. Gefäßendothel reagiert nicht.

6. Epitheliale Einzelzellen, die in das Stroma der Primärtumoren "abgetropft" sind oder in chemotherapiebedingten Narbenbezirken von Lymphknotenmetastasen liegen, zeigen TPA-Vorkommen (5/8 der Metastasen stellen Zustände nach Chemotherapie dar).

7. Das Verhalten des Seminomanteils im Kombinationstumor wird im Abschnitt 5.2.2. des Ergebnisteils behandelt.

Zusammenfassung:

* Differenziertes prismatisches und kubisches Epithel, in drüsiger oder zystischer Konfiguration, und einzeln liegende Epithelzellen zeigen durchwegs einen konstant positiven Reaktionsausfall.

* Nicht-verhornendes mehrschichtiges Plattenepithel weist in den basalen Zellschichten eine positive Reaktion auf.

* Plattenepithelmetaplasien reagieren nur partiell positiv.

* Verhornendes Plattenepithel läßt TPA nur inkonstant in den basalen Zellagen erkennen.

* Differenzierte Strukturen aus anderen Keimblättern, wie Fett, faserbildende Bindegewebe, Knorpel, Knochen, sowie Muskelgewebe, Blut und lymphatisches Gewebe, reagieren stets negativ.

* Gefäßendothelien ragieren nicht.

5.1.1.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34

1. Das verhornende Plattenepithel in 1/1 der Primärtumoren und 5/5 der Metastasen in den apikalen Zelllagen reagiert mit Anti-LP 34 (s. Abb. 5b). Dabei fällt eine Übergangszone auf, in der Zellen sowohl TPA, als auch LP 34 enthalten.

2. Metaplastisches Plattenepithel zeigt noch stärkere Reaktionsdifferenzen als in den TPA-Präparaten: 1/2 der Primärtumoren und 2/6 der Metastasen weisen in diesem Gewebstyp LP 34 auf. Weitere 2/6 der Me-

tastasen streuen in Zahl und Intensität der angefärbten Zellen.
Die übrigen 2/6 reagieren nicht.
Vice versa zum TPA scheint hier die Anlehnung an das Plattenepithel Voraussetzung für den positiven Reaktionsausfall zu sein.

3. In keinem anderen Gewebetyp konnte LP 34 nachgewiesen werden.

Zusammenfassung:

* LP 34 läßt sich in den apikalen Schichten des verhornenden Plattenepithels ohne Ausnahme nachweisen.

* Das Reaktionsverhalten in Plattenepithelmetaplasien ist inkonstant.

* Alle anderen Gewebe reagieren nicht.

Tab. 8: Untersuchungsgut "Malignes Teratom vom Intermediärtyp bzw. "Teratom plus Embryonales Karzinom"

1. Primärtumorn: n = 12

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 7 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 32 J. |
| 8 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 22 J. |
| 9 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 24 J. |
| 10 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 33 J. |
| 11 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 20 J. |
| 12 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 29 J. |
| 13 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 33 J. |
| 14 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 32 J. |
| 15 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Seminom | 39 J. |

Tab. 8 Fortsetzung:

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 16 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Seminom | 28 J. |
| 17 | Hoden | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters.<br>+ Seminom | 39 J. |
| 18 | Steiß-bein | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 6,5 Mon.<br>(weibl.) |

2. Metastasen - histologisch MTI: n = 2

| Fallnr. | Organ | Diagnose des Primärtumors | Alter | Chemo-therapie |
|---|---|---|---|---|
| 9 | LK | MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Dotters. | 24 J. | Ø |
| 19 | LK | (MTI/Teratom<br>+ Embr.Ca<br>+ Seminom) | 28 J. | nach Ch. |

Legende vgl. Tab. 4

Tab. 9: Gewebe in "Malignen Teratomen vom Intermediärtyp" bzw. "Teratome plus Embryonale Karzinome". Angegeben ist das grundsätzliche Vorkommen eines Gewebetyps, ohne Berücksichtigung des Anteils an der Gesamttumormasse. Angaben aus dem eignen Untersuchungsgut sind den Zahlen Pugh's (PUGH u. CAMERON, in Pugh 1976, S. 222ff.) gegenübergestellt.

| | Eigenes Material | | PUGH 1976 |
|---|---|---|---|
| | Primärtumoren n = 12 | Metastasen n = 2 | n = 308 |
| 1. EPITHELIEN: | | | |
| Plattenepithel | | | 201 (65 %) |
| - verhornend | 7 (58 %) | 2 | n.u. |
| - unverhornend | 6 (50 %) | 0 | n.u. |
| - metaplastisch | 9 (75 %) | 0 | n.u. |
| Zylinderepitehl | 12 (100 %) | 1 | 299 (97 %) |
| Kubisches Epithel | 12 (100 %) | 1 | 286 (93 %) |
| Schleim sezernierendes Epithel | 12 (100 %) | 1 | 155 (50 %) |
| Seromuköse Drüsen | 10 (83 %) | 0 | 24 (8 %) |
| Zilientragendes Epithel | n.u. | n.u. | 24 (8 %) |
| Hautanhangsgebilde | n.u. | n.u. | 4 (1 %) |
| Pigmentepithel | n.u. | n.u. | 19 (6 %) |
| 2. BINDEGEWEBE: | | | |
| Kollagenes BG | 12 (100 %) | 1 | 298 (97 %) |
| Knorpelgewebe | 7 (58 %) | 2 | 166 (54 %) |
| Knochengewebe | 0 (0 %) | 1 | 27 (9 %) |
| 3. MUSKELGEWEBE: | | | |
| Glatte Muskulatur | 9 (75 %) | 1 | 263 (85 %) |
| Skelettmuskulatur | 0 (0 %) | 0 | 12 (4 %) |
| 4. NERVENGEWEBE: | | | |
| Nervenzellen | n.u. | n.u. | 39 (13 %) |
| 5. MALIGNOM-GEWEBE: | | | |
| Per definitionem | 12 (100 %) | 2 | 308 (100%) |
| 6. EXTRAEMBRYONAL: | | | |
| Dottersackstrukturen | 10 (83 %) | 1 | n.u. |
| Synzytiotrophoblastäre Riesenzellen | 6 (50 %) | 0 | (40 %, PUG S. 230) |

5.1.2. Malignes Teratom vom Intermediärtyp (MTI) bzw. Teratom plus Embryonales Karzinom:

Bei dem MTI liegen neben eindeutig differenzierten Geweben, die zu dieser Diagnose berechtigen, entweder Tumoranteile mit Atypien in diesen selbst vor, oder es sind zusätzlich maligne, undifferenzierte Tumormassen vorhanden.
Dies wird für die Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse von Bedeutung sein, weil zunächst die differenzierten und atypischen - und im Anschluß daran die rein undifferenzierten Gewebe besprochen werden.

Das Untersuchungsmaterial mit dem histologischen Bild des MTI/Teratom plus Embryonales Karzinom, ist Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 9 gibt das Auftreten der verschiedenen Gewebearten in dieser Klasse an. Kriterium ist wiederum nur das grundsätzliche Vorkommen im Vergleich zu Angaben Pugh's (PUGH u. CAMERON, in Pugh 1976, S.222ff). Eine Aussage über den quantitativen Anteil an der Gesamttumormasse wird damit nicht gemacht.

5.1.2.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA

1. Das entsprechend Tab. 9 in 6 Primärtumoren vorkommende, nicht-verhornende Plattenepithel reagiert in den unteren Zellschichten in 5 von 6 Fällen (83 %) durchweg positiv und in 1/6 positiv mit Ausfällen. In den beiden Metastasen fehlt dieses Gewebe.

2. Verhornendes Plattenepithel liegt bei 7 Primärtumoren vor, reagiert bei 3/7 (43 %) basal positiv

(einer davon enthält positive atypisch verhorntes Plattenepithel), und bleibt bei den übrigen, wie auch in beiden Metastasen negativ.

3. Metaplastisches Plattenepithel ist in 9/9 Fällen (100 %) TPA-positiv. Die Intensitätsunterscheide sind dabei deutlich geringer als bei den "Differenzierten Teratomen".

4. Alle 12 Primärtumorfälle und eine Lymphknotenmetastase enthalten differenziertes prismatisches und kubisches Epithel. TPA läßt sich darin konstant in allen Zellen nachweisen. Auch organoide Strukturen, die von analogen Normalgewebe nicht zu unterscheiden sind, liegen vor.
Mucus in Becherzellen bleibt wieder TPA-negativ.
Neunmal (Fälle 10 bis 18) weist das Epithel leichte und dreimal (Fälle 11,13,17) schwere Atypien, wie z.B. Anisocytose, Mitosevermehrung, unscharfe Zellgrenzen etc. auf.
Die Intensität der Reaktion und die Zahl der immunhistochemisch dargestellten Zellen nimmt dabei mit zunehmender Atypie ab.
Bei den hochgradig atypischen Epithelzellen ist keine Reaktion mehr erkennbar.

5. Die rein undifferenzierten Tumoranteile lassen sich aufgrund fehlender typischer Merkmale keiner der genannten Gruppen zuordnen.
Sie zeigen, wie bei den "Malignen Teratomen vom undifferenzierten Typ" bzw. Embryonalen Karzinomen, noch zu erläutern sein wird, meist karzinomatöse, seltener sarkomatöse Zellstrukturen.
Die hier untersuchten Präparate bieten alle den karzinomatösen Typ mit follikulärem, papillärem oder solidem Wachstum. Die Masse dieser Zellen erscheint

unabhängig vom Wachstumsmuster TPA-negativ (s.Abb.4). In einzelnen Zellen, die sich lichtmikroskopisch nicht von den übrigen Karzinomzellen unterscheiden, läßt sich jedoch das TPA in 9 von 11 Primärtumoren nachweisen (82 %).
Assoziieren sich atypische Zellen zu grob drüsig gebauten Strukturen mit zumindest angedeuteter organoider Zellanordnung, z.B. auch nur basal gelegenen Kernen, so wird in diesen "Primitivdrüsen" TPA nachweisbar. 3/3 Primärtumoren mit solchen Gebilden zeigen hier eine positive TPA-Reaktion (s. Abb. 4).

6. Extraembryonale Gewebe wie synzytiotrophoblastäre Riesenzellen und Dottersacktumor kommen in MTI vor:
6 von 6 Primärtumoren mit synzytialen Riesenzellen zeigen eine positive Anti-TPA-Reaktion in diesen Zellen (s. Abb. 7). Vergleiche mit Beta-HCG-Präparaten zeigen die gleichen Zellen angefärbt.
Dottersackanteile, die in Anti-Alpha-Fetoprotein-Färbungen positiv reagieren, weisen in 10/10 der Primärtumoren und 1/1 Metastase ebenfalls intrazytoplasmatisches TPA auf (100 %).
Auf diese Ergebnisse wird noch gesondert eingegangen werden.

7. Die Seminomanteile der Kombinationstumoren werden mit den reinen Seminomen behandelt.

Zusammenfassung:

* Differenziertes prismatisches und kubisches Epithel reagiert stets positiv. Atypische, als Adenokarzinome anzusehende Drüsenepithelien zeigen dagegen Ausfälle in diesem Reaktionsverhalten.

* In nicht-verhornendem mehrschichtigem Plattenepithel läßt sich basal immer TPA nachweisen.

* Plattenepithelmetaplasien in MTI sind durchweg TPA-positiv.

* Verhornendes Plattenepithel reagiert nur teilweise in den basalen Zellagen.

* Gefäßendothelien reagieren nicht.

* Differenzierte mesenchymale Gewebeformen verhalsich negativ.

* Rein undifferenzierte Tumoranteile bleiben mit Ausnahme einzelner Zellen und primitiver Drüsen negativ.

* Extraembryonale Gewebe, wie Dottersack oder synzytiotrophoblastäre Zellmassen, lassen sich mit Anti-TPA darstellen.

5.1.2.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34:

1. Das verhornende Plattenepithel in 7/7 Primärtumoren (100 %) und 2/2 Metastasen reagiert in den apikalen Zellagen positiv. Im Fall Nr. 10 zeigen auch atypische Zellen einen positiven Reaktionsausfall.
Die beim "Differenzierten Teratom" erwähnte Zone mit Zellen, die sowohl TPA als auch LP 34 enthalten, ist auch hier erneut nachweisbar.

2. Nur einer von 9 (11 %) Primärtumoren mit metaplastischem Plattenepithel zeigt in allen metaplastischen

Zellen LP 34.
4/9 weisen - zum Teil deutliche - Ausfälle auf (44 %) und 4/9 reagieren negativ (44 %).

3. Die übrigen differenzierten und undifferenzierten Tumoranteile lassen sich mit Anti-LP 34 immunhistologisch nicht anfärben.

Zusammenfassung:

* LP 34 findet sich ohne Ausnahme in den apikalen Schichten des mehrschichtigen verhornenden Plattenepithels, auch bei Vorliegen atypischer Zellen.

* In Plattenepithelmetaplasien herrscht ein uneinheitlicher Reaktionsmodus vor, meist positiv mit deutlichen Ausfällen.

* Alle übrigen differenzierten und undifferenzierten Gewebe reagieren negativ.

Tab. 10: Untersuchungsgut "Malignes Teratom vom undifferenzierten Typ" bzw. "Embryonales Karzinom"

1. Primärtumoren: n = 9

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 20 | Hoden | MTU/Embr.Ca | 29 J. |
| 21 | Hoden | MTU/Embr.Ca | 37 J. |
| 22 | Hoden | MTU/Embr.Ca | 29 J. |
| 23 | Hoden | MTU/Embr.Ca + Dotters. | 31 J. |
| 24 | Hoden | MTU/Embr.Ca + Dotters. | 36 J. |
| 25 | Hoden | MTU/Embr.Ca + Dotters. | 28 J. |
| 26 | Hoden | MTU/Embr.Ca + Dotters. + Sem.in s. | 27 J. |
| 27 | Hoden | MTU/Embr.Ca + Seminom | 44 J. |
| 28 | Hoden | MTU/Embr.Ca + Dotters. + Seminom | 39 J. |

2. Metastasen - histologisch MTU: n = 2

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter | Chemotherapie |
|---|---|---|---|---|
| 7 | LK | MTI/Teratom + Embr.Ca + Dotters. | 32 J. | vor Ch. |
| 29 | LK | (MTI/Teratom + Embr.Ca) (1958) | 47 J. | Ø |

Legende vgl. Tab. 4

### 5.1.3. Malignes Teratom vom undifferenzierten Typ (MTU) bzw. Embryonales Karzinom

In dieser Gruppe kommen nur noch undifferenzierte Gewebe vor, meist primitive epitheliale Zellen. Sarkomzellen, wie von PUGH u. CAMERON (in Pugh 1976, S. 224) beschrieben, sind in den hier untersuchten Fällen nicht aufgetreten.
Das histologische Spektrum reicht von soliden anaplastischen Tumorzellverbänden über papilläre, follikuläre und tubuläre Formen mit primitivem mesenchymalem Stroma, bis zu Tumoren, die an Adenokarzinome erinnern.
Häufig kommen synzytiotrophoblastäre Riesenzellen und v.a. Dottersacktumoranteile als extraembryonale Gewebe vor. Talerman gibt eine Gesamthäufigkeit retrospektiv von 29 % und prospektiv von 44 %, Löhrs von 45 % und Horn und Mitarbeiter von 53 % für Dottersackanteile in NSKZT an (TALERMAN 1980, LÖHRS 1982, HORN et al. 1980).
In der reinen Form ist der Dottersacktumor verhältnismäßig selten und tritt dann meist bei Kindern bis zum 15. Lebensjahr auf (zur Nomenklatur vgl. Klassifikations-Kapitel).
Histologisch ist er gekennzeichnet durch ein lockeres vakuoläres Netzwerd von Zellen, die z.T. endothelartig abgeflacht sind (LÖHRS 1982) und oft blutgefüllte Sinus umkleiden. Daneben erkennt man jedoch auch eher drüsige Zellen mit hellem Zytoplasma (LÖHRS 1982) und tubulärem oder papillärem Wachstum, das an ein Adenokarzinom erinnert (BROWN, in Pugh 1976, S. 358). Oft produzieren diese Tumoren Schleim.

Als charakteristisch gelten sog. "Schiller-Duval-Körper", perivaskuläre Strukturen, welche den endodermalen Sinus der Rattenplazenta ähneln (TEILUM 1971).

Die untersuchten Präparate mit dem histologischen Bild eines MTU/Embryonalen Karzinoms sind Tab. 10 zu entnehmen.

An noch differenzierbaren Strukturen in dieser Kategorie lassen sich
a. primitive Drüsen (in 5/9 Primärtumoren (56 %) und 1/2 Metastasen (50 %))
b. Dottersackelemente (in 5/9 Primärtumoren (56 %) und 1/2 Metastasen (50 %))
c. Riesenzellen, synz. (in 7/9 Primärtumoren (78 %)) nachweisen.

5.1.3.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA
Quantitativ stellt sich das Ergebnis folgendermaßen dar:
1. In 5/9 (56 %) Primärtumorfällen finden sich stark angefärbte einkernige Zellen, die sich ansonsten lichtmikroskopisch nicht von den übrigen, nicht-reagierenden Zellen unterscheiden.
Bei weiteren 2/9 (22 %) und einer Metastase ist die Anfärbung ebenfalls vorhanden, aber weniger intensiv.

2. Primitive Drüsen, in 5 Primärtumoren und einer Metastase vorliegend, reagieren bei 4/5 (80 %) und in der LK-Tochtergeschwulst deutlich, mit nur geringen Ausfällen TPA-positiv.
Der fünfte Fall (Nr. 27) zeigt stärkere Ausfälle. Bemerkenswert ist hierbei, daß in einem ganz undifferenzierten Karzinom (Fall 22) erst durch die Immunhistochemie eine drüsige Konfiguration der Tumorzellen als solche identifiziert werden konnte (s.Abb. 4).

3. Dottersackelemente sind in 5 von 5 Primärtumoren und in 1/1 Metastase TPA-positiv (s.Abb. 6).

4. Synzytiotrophoblastäre Riesenzellen zeigen in 7/7 Primärtumorfällen eine positive Reaktion.

Zusammenfassung:

* Das Gros der undifferenzierten Zellen reagiert negativ. Nur einzelne Zellen zeigen einen - unterschiedlich starken - positiven Reaktionsausfall.

* Primitive Drüsen lassen regelmäßig TPA erkennen, Reaktionsstärke und Prozentsatz der positiven Zellen variieren jedoch.

* Dottersacktumoranteile sind immer positiv.

* Synzytiotrophoblastäre Riesenzellen reagieren stets positiv.

5.1.3.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34

* In keinem Präparat eines MTU/Embryonalen Karzinoms läßt sich LP 34 nachweisen.

Tab. 11: Untersuchungsgut "Malignes Teratom vom trophoblastischen Typ" bzw. "Teratom plus Embryonales Karzinom/Embryonales Karzinom plus Chorionkarzinom"

Primärtumoren: n = 6

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 30 | Hoden | MTT/ hier nur MTI/Teratom + Embr.Ca + Dotters. | 22 J. |
| 31 | Hoden | MTT/Teratom + Embr.Ca + Chorionca. + Dotters. | 26 J. |
| 32 | Hoden | MTT/Embr.Ca + Chorionca. | 36 J. |
| 33 | Hoden | MTT/Embr.Ca + Chorionca. | 28 J. |
| 34 | Hoden | MTT/Embr.Ca + Chorionca. + Dotters. | 24 J. |
| 35 | Hoden | MTT/Embr.Ca + Chorionca. + Dotters. + Seminom | 30 J. |

Legende vgl. Tab. 4

### 5.1.4. Malignes Teratom vom trophoblastischen Typ (MTT) bzw. Teratom und/oder Embryonales Karzinom plus Chorionkarzinom

Die bezüglich der Nomenklatur bestehenden Unterschiede zwischen beiden Klassifikationen wurden bereits dargestellt.
In praxi weicht man vom eigentlichen MTT-Begriff insofern ab, als villöses Wachstum nicht unbedingt vorliegen muß, sondern zusammenhängendes trophoblastisches und synzytiotrophoblastisches Gewebe zur Diagnosestellung ausreicht. Keinesfalls genügt dazu das alleinige Vorliegen von HCG-produzierenden Riesenzellen, die keinen negativen Einfluß auf die Prognose haben (PUGH und CAMERON, in Pugh 1976, S. 242).
Der Anteil an der Gesamttumormasse ist jedoch für die Diagnose unbedeutend. So kann es vorkommen, daß in zahlreichen Schnittstufen kein Chorionkarzinomanteil enthalten ist: Histologisch liegt z.B. im Fall 30 lediglich ein MTI mit Riesenzellen vor, während die Diagnose "MTT" bereits vorher gesichert war.

Das Untersuchungsgut "MTT" ist Tab. 11 zu entnehmen.

In zwei Fällen treten Chorionkarzinomelemente in Verbindung mit einem Teratom plus Embryonalen Karzinom, in vier Fällen mit einem Embryonalen Karzinom kombiniert auf.
Chorionkarzinomanteile, abzüglich des oben beschriebenen Falls also fünfmal.
Riesenzellen sind dagegen in allen 6 Tumoren nachzuweisen.
Dottersackelemente sind Bestandteil in vier Fällen.

5.1.4.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA

Hierzu ist anzuführen:
1. An mit TPA reagierenden differenzierten Geweben kommen vor:
- metaplastisches Plattenepithel, positiv in 1/1 Fall,
- kubisches, prismatisches und schleimproduzierendes Epithel, in zwei der zwei Tumoren (Fall 30 u. 31) positiv.
- verhornendes Plattenepithel (1 Fall), ebenso wie alle übrigen differenzierten Anteile negativ.

2. Die Embryonalen Karzinome weisen, bei negativer Reaktion der Tumorzellmasse, in je 3/4 (75 %) Fällen positive Einzelzellen und positive primitive Drüsen auf. Wieder imponiert die Abhängigkeit der Reaktionsstärke vom Differenzierungsgrad.

3. Trophoblastische und synzytiotrophoblastische Zellverbände lassen sich in 5/5 Fällen mit Anti-TPA darstellen (s.Abb. 7).

4. Synzytiotrophoblastische Riesenzellen reagieren in 4/6 (67 %) Fällen stark positiv, zweimal ist das Ergebnis schwächer (Artefakt?).

5. Dottersackelemente treten hier bemerkenswerterweise zweimal mit deutlichen Zellatypien auf. Die Reaktionsstärke ist dabei wiederum abgeschwächt. Die verbleibenden 2/4 Fälle mit reifem Dottersack reagieren deutlich positiv.

Zusammenfassung:
* Die differenzierten Gewebe mit und ohne Atypien in

den beiden Fällen mit der Grundstruktur "Teratom plus Embryonales Karzinom" verhalten sich wie die unter "MTI" beschriebenen Gewebe.

* Undifferenzierte Embryonale-Karzinom-Anteile zeigen erneut negative Reaktion, bis auf positive Einzelzellen und primitive Drüsen.

* Trophoblastische und synzytiotrophoblastische Gewebe reagieren immer TPA-positiv.

* Synzytiotrophoblastische Riesenzellen sind positiv, in zwei Fällen ist die Reaktion aber schwächer als gewöhnlich.

* Typische reife Dottersackanteile zeigen TPA, treten Atypien in der Struktur auf, nimmt die Reaktionsstärke ab.

5.1.4.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34

* Verhornendes Plattenepithel in einem differenzierten Tumoranteil reagiert in den apikalen Zellagen positiv.

* Alle übrigen Gewebe zeigen negative Reaktion.

Tab. 12: Untersuchungsgut "Seminom" und Seminomanteile der Kombinationstumoren

1. Reine Seminome: n = 11

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 36 | Hoden | Seminom (klass.) | 26 J. |
| 37 | Hoden | Seminom (klass.) | 37 J. |
| 38 | Hoden | Seminom (klass.) | 30 J. |
| 39 | Hoden | Seminom (klass.) | 38 J. |
| 40 | Hoden | Seminom (klass.) | 43 J. |
| 41 | Hoden | Seminom + synz.Rz. | 39 J. |
| 42 | Hoden | Seminom + synz.Rz. | 33 J. |
| 43 | Hoden | Seminom + synz.Rz. | 27 J. |
| 44 | Hoden | Seminom (anapl.) | 39 J. |
| 45 | Hoden | Seminom (anapl.) | 24 J. |
| 46 | Hoden | Seminom (anapl.) | 39 J. |

2. Seminomanteile in Kombinationstumoren[1]: n = 8

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 2 | Hoden | Seminom + TD | 30 J. |
| 15 | Hoden | Seminom + MTI | 39 J. |
| 16 | Hoden | Seminom + MTI | 28 J. |
| 17 | Hoden | Seminom + MTI | 39 J. |
| 26 | Hoden | Sem.in si. + MTU | 27 J. |
| 27 | Hoden | Seminom + MTU | 44 J. |
| 28 | Hoden | Seminom + MTU | 39 J. |
| 35 | Hoden | Seminom + MTT | 30 J. |

Legende:

(klass.) = klassischer Typ
+ synz.Rz. = mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen

(anapl.) = anaplastischer Typ

1 = auf erneute ausführliche Darstellung des nicht-seminomatösen Tumoranteils wurde hier verzichtet. Nur TTP-Kurzformen werden angegeben.

Sem.in si. = Seminoma in situ

## 5.2. Seminomatöse Keimzelltumoren und seminomatöse Anteile der Kombinationstumoren

Bereits 1906 grenzte Chevassu das "Seminom" aufgrund seines einheitlichen histologischen Bildes von den anderen Tumoren des Hodens ab.

### 5.2.1. Darstellung der Untergruppen

#### 5.2.1.1. Der Klassische Typ

Der von Chevassu beschriebene "Klassische Typ" ist gekennzeichnet durch ballenartig gelagerte Zellen. Das Zellbild ist charakterisiert durch monoton gebaute Tumorzellen mit glykogenhaltigem Zytoplasma und runden bis ovalen Kernen mit scholligem Chromatin. Die Zellgrenzen sind deutlich erkennbar.
Typischerweise findet sich eine rundzellige Entzündungsreaktion in den Bindegewebssepten, welche die Seminom-Zellballen unregelmäßig begrenzen. Die Ausbildung epitheloidzelliger Granulome mit Langhans'schen Riesenzellen ist nicht ungewöhnlich.
(LÖHRS 1982; THRACKRAY und CRANE, in Pugh 1976, S.164; MOSTOFI 1973; HEDINGER et al. 1979)

#### 5.2.1.2. Seminom mit synzytiotrophoblastischen Riesenzellen

In unterschiedlicher Häufigkeit sind Beta-HCG-produzierende Riesenzellen vom synzytiotrophoblastischen Typ in Seminome eingestreut.
In der Literatur werden folgende Zahlen über das Vorkommen in reinen Seminomen gegeben:

| | |
|---|---|
| DIXON und MOORE, 1952 | 14 % |
| THRACKRAY und CRANE, 1976 | 6 % |
| WURSTER, 1976 | 2 % |
| HEDINGER et al., 1979 | 6 % |
| LÖHRS, 1982 | 17 % |

Ob bei Vorliegen von synzytiotrophoblastischen Riesenzellen eine Veränderung der Prognose eintritt und diese Seminome damit als eigene Kategorie aufgefaßt werden müssen, vermag bislang nicht beantwortet zu werden.

5.2.1.3. Seminoma in situ

In der Nachbarschaft solider Seminome oder nicht-seminomatöser Keimzelltumoren lassen sich in noch intakten Tubuli seminiferi bisweilen sog. "In-situ-Veränderungen" von Keimzellen im Sinne einer malignen Transformation beobachten.
SCHULZE und HOLSTEIN (1977) postulieren, daß sich das Seminom aus diesen intratubulären Vorstufen entwickelt.

5.2.1.4. Der anaplastische Typ

Neben der klassischen Form beschreiben MOSTOFI und PRICE (1973) das sog. "Anaplastische" Seminom und zeigen eine schlechtere Prognose für diesen Typ auf. Die histologische Definition ist nicht exakt. Angegeben werden eine höhere Zell- und Kernpolymorphie, das mögliche Fehlen der interstitiellen Entzündung und eine signifikant höhere Mitosenzahl. Von HOCHSTETTER (1981) fordert eine Mitosenhäufigkeit von mindestens 5 Mitosen/HPF (High Power Field, Blickfeld bei hoher Vergrößerung, in der Regel 400x). Differentialdiagnostisch können sich Schwierigkeiten ergeben in der Abgrenzung anaplastischer Seminome von völlig undifferenzierten Embryonalen Karzinomen. Harte Kriterien zur Abgrenzung gegen das "typische" Seminom existieren nicht. Das drückt sich in den unterschiedlichen Häufigkeitsangaben aus.
So gehören nach MOSTOFI und PRICE (1973) 10%, nach THRACKRAY und CRANE (in: Pugh, 1976, S. 182) 3 % aller Seminome dem anaplastischen (in der englischen Nomenklatur "atypisch" genannten) Typ an.

5.2.1.5. Spermatozytäres Seminom

Als letzte Variante sei noch das "Spermatozytäre" - Seminom (MASSON 1946) angeführt.
Ungleichmäßig große Zellkerne, obligat fehlende Entzündung und Zytoplasmabrücken zwischen den Tumorzellen, die verschiedene Stadien der Spermatogenese imitieren, sind histologische Kennzeichen.
Anteilmäßig machen sie 3,7 % aller Seminome aus, kommen vor allem in höherem Lebensalter vor und haben eine gute Prognose (THRACKRAY und CRANE, in Pugh 1976, S. 182).

Daneben können Seminome mit allen NSKZT kombiniert vorkommen.

Das Untersuchungsgut "Seminom" kann Tab. 12 entnommen werden.
Es umfaßt 11 reine Seminome, davon 3 mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen und 3 vom anaplastischen Typ. Hinzu kommen 8 Seminomanteile aus Kombinationstumoren, davon ein Seminoma in situ.

5.2.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA

Zahlenmäßig kommt man zu folgenden Resultaten:

1. In keinem Fall der 11 reinen Seminome und der 8 Seminomanteile von Kombinationstumoren (davon ein Seminoma in situ) ist eine TPA-Reaktion nachzuweisen.

2. in 3 Fällen kommen synzytiotrophoblastische Riesenzellen vor.
In 2/3 (67 %) Tumoren stellen sich die synzytialen Zellhaufen positiv dar und auch einkernige HCG-positive Zellen zeigen positive TPA-Reaktion (s. Abb. 8).
In einem Tumor fällt die Reaktion in einem Abschnitt mit diesem Riesenzelltyp negativ aus (Artefakt?).

3. Alle übrigen Gewebe in Seminomen zeigen kein TPA.

Zusammenfassung:

* Klassisches und anaplastisches Seminomgewebe und Seminoma in situ reagieren stets TPA-negativ.

* Riesenzellen vom synzytiotrophoblastischen Typ sind in der Regel positiv.

* Lymphatisches Gewebe, einschließlich Langhans'schen Riesenzellen, reagiert negativ.

* Bindegewebsstrukturen verhalten sich TPA-negativ.

2.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34

* LP 34 kann in keinem Seminom oder Seminomanteil nachgewiesen werden.

Tab. 13: Untersuchungsmaterial "Weitere Tumoren des Hodens und des Skrotalinhaltes":

1. Tumoren des Gonadenstromas: n = 2

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 47 | Hoden | Leydig-zelltumor | 28 J. |
| 48 | Hoden | Leydig-zelltumor | 33 J. |

2. Paratestikuläre Tumoren: n = 3

| Fallnr. | Organ | Diagnose | Alter |
|---|---|---|---|
| 49 | Neben-hoden | Adenomatoid-tumor | 40 J. |
| 50 | Samen-strang | Juveniles Rhabdomyo-sarkom | 4 J. |
| 51 | Samen-strang | Juveniles Rhabdomyo-sarkom | ? |

Legende:

? = keine Angabe vorhanden, Konsiliarfall.

## 5.3. Weitere Tumoren des Hodens und des Skrotalinhaltes

Hier wurden einige der seltenen Tumoren des testikulären Gonadenstromas und paratestikuläre Tumoren des Nebenhodens und Samenstranges untersucht.

Als Beispiele der ersten Gruppe sind Leydigzelltumoren zu nennen, die von den endokrin aktiven Leydigzellen des Hodens ausgehen.

Bei den Tumoren des Nebenhodens dominieren die Adenomatoidtumoren, gutartige Geschwülste aus drüsenartigen Formationen mit glatter Muskulatur und Lymphozytenherden (HEDINGER 1977).
Auch bei dieser Tumorform ist die Histogenese noch ungeklärt. Oft werden sie auf Reste der Müller'schen Gänge zurückgeführt, ein anderer Ansatz sieht in ihnen Wucherungen der mesothelialen Deckzellen (HEDINGER 1977).

Mesodermaler Herkunft sind die, sich von quergestreiften Muskelzellen des Samenstranges ableitenden und meist bei Kindern vorkommenden, sehr malignen Juvenilen Rhabdomyosarkome.

Einzelheiten zum Untersuchungsmaterial sind Tab. 13 zu entnehmen.

### 5.3.1. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-TPA

Im einzelnen:
1. in 2/2 Leydigzelltumoren findet sich in den Tumorzellen nie das Vorkommen von TPA.

2. Im Fall des Adenomatoidtumors reagiert das drüsige Epithel positiv, die glatte Muskulatur und lymphatisches Gewebe negativ.

3. Bei beiden Juvenilen Rhabdomyosarkomen ist festzustellen, daß die Sarkomzellen nie TPA aufweisen.

Zusammenfassung:

* Leydigzelltumoren reagieren negativ.

* Drüsenartige Formationen im Adenomatoidtumor zeigen positive TPA-Reaktion.
  Glatte Muskulatur und lymphatisches Gewebe sind negativ.

* In Juvenilen Rhabdomyosarkomen läßt sich kein TPA nachweisen.

3.2. Reaktionsverhalten gegenüber Anti-LP 34

* Alle untersuchten Geschwülste reagieren negativ.

## 6. DISKUSSION

Immunhistochemische Verfahren haben sich gerade in der pathohistologischen Diagnostik der Keimzelltumoren des Hodens durchgesetzt. Verfahren zum Nachweis von Dottersackstrukturen durch Alpha-Feto-Protein (AFP) und Chorionkarzinomanteilen durch Beta-Humanes-Chorion-Gonadotropin (HCG) gehören zur Routine. Korrelationen zum klinisch-serologischen Nachweis dieser sog. Tumormarker liegen vor (JAVADPOUR 1980, MANN et al. 1981).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Umfang es sinnvoll ist, auch das tumor-assoziierte Tissue-Polypeptide-Antigen (TPA) und Keratine, wie die Fraktion LP 34, in die Diagnostik mit einzubeziehen.
Für das TPA liegen Hinweise vor, die einen routinemäßigen Einsatz gerechtfertigt erscheinen lassen. So wird das TPA als "Proliferationsantigen" (SKRYTEN et al. 1981) aufgefaßt, da in klinisch-serologischen Studien bei der Mehrzahl der Patienten mit unterschiedlichen primären Organkarzinomen im Stadium der klinisch faßbaren Tumorprogression erhöhte TPA-Werte nachgewiesen wurden. Die Schwankungen zwischen und innerhalb den verschiedenen Organtumorkollektiven sind jedoch z.T. erheblich. Z.B. war das TPA nur bei 57 % der Patienten mit primären malignen Hodentumoren im Stadium der Tumorprogression erhöht (ebenda).
Vor allem fehlt in allen Arbeiten eine Korrelation zwischen Serologie und histologischer Karzinomklassifikation. Eine Differenzierung der Ergebnisse ist umsomehr zu fordern, wenn eine Organtumorgruppe so heterogen zusammengesetzt ist, wie die testikulären Keimzellgeschwülste.

Andererseits bieten sich die Keimzelltumoren gerade wegen ihrer morphologischen Vielfalt als Modell für diese Fragestellung an.

Anhand der Ergebnisse wird im folgenden diskutiert werden:

1.1. In welchen Zellen TPA/LP 34 nachweisbar ist.

1.2. Inwieweit eine Vergleichbarkeit zwischen Keimzelltumoren und normalen Zellen bzw. nicht-germinalen Tumorzellen möglich ist.

2. Ob das TPA tatsächlich als "Proliferationsantigen" anzusehen ist.

3. Wo die Ursachen der Unterschiede im serologischen TPA-Nachweis zwischen verschiedenen Organtumorkollektiven und innerhalb einer Organtumorgruppe zu suchen sind.

4. Ob die immunhistologische Anti-TPA-/Anti-LP 34 - Reaktion ein Hilfsmittel in der Differentialdiagnose maligner Tumoren darstellt.

Wie im Ergebnisteil dargelegt, ist das TPA in nichtseminomatösen Keimzelltumoren im Zytoplasma von verschiedenartigem, differenziertem Drüsenepithel, bis hin zu mäßig differenzierten Adenokarzinomen nachweisbar. Auch kleinere, sonst schlecht identifizierbare Reste kubischen oder prismatischen Epithels in fibrosiertem Stroma zeigen das Antigen.
Epidermisartiges, verhornendes Plattenepithel reagiert negativ, nur bisweilen sind Basalzellen positiv.
Mehrschichtiges nicht-verhornendes Plattenepithel

läßt regelmäßig TPA in den basalen Zellschichten erkennen.
In Plattenepithelmetaplasien sind graduelle Übergänge zu beobachten.
Das undifferenzierte, stark proliferierende Epithel des Embryonalen Karzinoms reagiert mit Ausnahme einzelner Zellen negativ.
Seminomzellen sowie atypische und typische intratubuläre Keimzellen reagieren ebenfalls negativ.
Rete testis und Nebenhoden sind positiv.

TPA (n. Björklund) in KEIMZELLTUMOREN

| POSITIV | NEGATIV |
|---|---|
| Drüsenbildendes Epithel (beginnend bei gering - mäßiggr. Diff.) | Verhornendes Plattenepithel |
| Metapl. Plattenepithel (partiell) | Undiff./embryon. Ca. |
| Dottersack-Tumor | Seminom |
| Synzytiotrophoblastäre Riesenzellen und einzelne einkernige Zellen (entspr. HCG) | Mesenchymale Tumoranteile |
| (Rete testis, Nebenhoden) | (Keimepithel, Sertoli-, Leydig-Z.) |

Tab. 14

Eine positive Reaktion findet sich in den endothelartigen Zellen von Dottersackstrukturen und in synzytiotrophoblastären Riesenzellen (sz.RZ.) von NSKZT und Seminomen, dabei vereinzelt auch in einkernigen Vorläufer-Zellen, entsprechend der früher nachgewiesenen positiven Anti-HCG-Reaktion (LÖHRS 1982).

Zusammenhängende Chorionkarzinomanteile zeigen ebenfalls TPA-Vorkommen.
Sertoli-, Leydigzellen und Leydigzelltumoren reagieren negativ, drüsenartige Formationen in einem Adenomatoidtumor positiv.
TPA ist nie in nicht-epithelialen Zellen oder Geweben nachweisbar.
Tab. 14 faßt die Ergebnisse für TPA nochmals zusammen.

LP 34 ist nur in den apikalen Schichten des differenzierten und höchstens leicht atypischen, verhornenden Plattenepithels aufzufinden.
Metaplastisches Plattenepithel reagiert inkonstant, alle übrigen Strukturen negativ.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die differenzierten Gewebe in Keimzelltumoren des Hodens in ihrem TPA- und LP 34-Verteilungsmuster nicht von Normalgeweben (NATHRATH et al. 1983) unterscheiden.
Etwas weicht nur das verhornende Plattenepithel in NSKZT von der normalen Epidermis ab. Die Epidermis weist auch basal kein TPA auf. Nur im Epithel der äußeren Haarwurzelscheide läßt sich TPA in den basalen Zellagen darstellen.
Die in den KZT manchmal positive Basalzellschicht könnte somit als ein in Richtung "äußere Haarwurzelscheide" differenziertes Epithel gedeutet werden.

Auch bei Vorliegen atypischer oder maligner Gewebe bestehen keine Abweichungen des TPA in KZT im Vergleich zu Arbeiten an anderen Organtumoren (BJÖRKLUND V. et al. 1982; NATHRATH, pers.Mitt.).

Die theoretischen Überlegungen, die das TPA den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts genauer einer Zytokeratinuntergruppe für drüsige Epithelien zu-

ordnen, stimmen mit den Ergebnissen überein.
TPA ist in den Zellen stets nur im Zytoplasma aufzufinden, während der Zellkern nie das Antigen zeigt.
Der Befund, daß in manchen Zellen scheinbar die Zellmembran positiv ist, erklärt sich als fixationsbedingtes Kondensations- und Schrumpfungsphänomen, da bei genauer Betrachtung ein perinukleäres Zytoplasma fehlt.

Histogenetisch läßt sich feststellen, daß die differenzierten Gewebe in NSKZT, neben ihrer licht- und elektronenmikrosopischen Übereinstimmung, auch auf der molekularen Ebene der Strukturproteine völlig den Normalgeweben entsprechen.
Sie stellen also keine andere Gewebeart dar, sondern lassen den gleichen Grundbauplan erkennen.
Dies ist als indirekter Hinweis auf die Gültigkeit der Keimzell- und Blastomerentheorie zu werten, die eine grundsätzlich gleichartige Entwicklung von Normal- und Tumorgewebe postulieren.

Bei der weitgehenden Identität differenzierter Teratome und somatischer Gewebe, drängt sich die Frage auf, ob es bei diesem Tumortyp histologisch überhaupt gerechtfertigt ist, von einem malignen Tumor zu sprechen. Denn die im klinischen Verlauf auftretende Proliferation und Metastasierung findet kein pathohistologisch erkennbares Korrelat.
Es muß allerdings als zweifelsfrei erwiesen festgehalten werden, daß auch reine differenzierte Teratome metastasieren.

Das phylogenetisch relativ alte TPA (BJÖRKLUND B. und BJÖRKLUND V., 1983) zeigt im vorliegenden Material die Charakteristika eines Markers für drüsige Epithelien:

Es ist bereits ab einem sehr frühen ontogenetischen Differenzierungsgrad (Embryonen, extraembryonale Gewebe) und bis zu einem sehr hohen Entdifferenzierungsgrad (Adenokarzinom) dieses Gewebetyps nachweisbar. Maximalen Ausfall der immunhistochemischen Reaktion bietet jedoch das reife, voll differenzierte Drüsenepithel, so daß man von einem "Differenzierungsmarker" sprechen kann.
Für eine Kennzeichnung besonders proliferativer Gewebe findet sich dagegen im vorliegenden Untersuchungsgut kein Anhalt. Die zellbiologischen Studien Björklunds (BJÖRKLUND B. und BJÖRKLUND V. 1983), nach welchen das TPA nach Abschluß der Mitose in die umgebende interstitielle Flüssigkeit abgegeben wird und somit eine hohe Proliferationsaktivität zu hohen TPA-Plasmaspiegeln führt, lassen sich nicht nachvollziehen.
Alle entdifferenzierten, schnell wachsenden Embryonalen Karzinome zeigen TPA nur in Einzelzellen, während das Gros des Tumors negativ reagiert. Das Argument, alle diese Tumorzellen befänden sich gerade außerhalb der S-Phase und des Mitosestadiums, in einem Zustand also, der keinen TPA-Nachweis zuläßt, ist nicht haltbar.
Erstens kommt ein so synchrones Wachstum bei einem einzelnen malignen Tumor nicht vor, so daß zumindest mehrere Zellinien TPA aufweisen müßten, zweitens erscheint es noch unwahrscheinlicher, daß alle untersuchten Embryonalen Karzinome in diesem TPA-freien Stadium getroffen worden sind.
TPA-positive Einzelzellen sind jedoch möglicherweise höher differenziert als der Resttumor und werden nur aufgrund ihres langsamen Wachstums durch das Embryonale Karzinom supprimiert. Unter geeigneten Bedingungen könnten sie aber komplette somatische Gewebe bilden.

Als Beispiel sei die Tatsache angeführt, daß Metastasen von NSKZT äußerst selten nur aus differenzierten Geweben bestehen.
Nach einer Chemotherapie aber, trifft man weitaus häufiger ein Bild an, das völlig dem von Normalgewebe entspricht.
Im untersuchten Material finden sich hierfür Beispiele:
Bei sechs der untersuchten Metastasen (5 Lymphknoten-, 1 Lungenmetastase) war eine Chemotherapie nach dem sog. Einhorn-Schema (EINHORN und DONOHUE 1977) der Gewebsentnahme vorausgegangen, - fünfmal fand sich ein differenziertes Teratom, einmal ein MTI.
Dabei waren die Primärtumoren in 6 Fällen MTI.
Bei einem Tumor hatte die Histologie eines LK vor der Chemotherapie die Diagnose MTU ergeben.

Für diesen Vorgang kommen nur zwei Mechanismen in Frage (OOSTERHUIS et al. 1983):
Die Selektion differenzierter Zellen oder die Induktion der Differenzierung durch die Chemotherapie.
Der Selektion kommt dabei nach OOSTERHUIS (ebenda) die entscheidende Bedeutung zu.
Ohne differenzierungsfähige Zellen wird das schnell proliferierende Embryonale Karzinom völlig von der Therapie erfaßt und durch Umwandlung des Tumors in Narbengewebe die Geschwulst ausgeheilt.
Bei Vorliegen differenzierter, langsam wachsender Zellen, entgehen diese der Chemotherapie, bekommen durch sie sogar einen Selektionsvorteil und bilden letztlich ein TD oder bleiben als einzelne Zellen im Narbengewebe liegen.
TPA-positive differenzierte Epithelzellen in "ausgebrannten" Teratomen und differenzierte Gewebe in Metastasen nach Chemotherapie, belegen dies.

Sicher kann mit der geringen Fallzahl kein endgülti-

ger Beweis für die Richtigkeit dieser Hypothese erbracht werden. Andererseits könnte durch den Nachweis TPA-positiver Einzelzellen in Embryonalen Karzinomen vorausgesagt werden, ob als Residuum einer Chemotherapie ein differenziertes Teratom im Körper verbleibt, oder bei Fehlen dieser Zellen das Tumorgewebe zerstört wird.
Offen muß auch bleiben, ob dem Mechanismus der Differenzierungs-Induktion durch die Chemotherapie wirklich keine Bedeutung beizumessen ist.
Dies erscheint durch die Tatsache, daß reine Embryonale Karzinome auch als TD metastasieren, zumindest fraglich (LÖHRS 1984, unveröffentlicht).

Die Reaktionsunterschiede in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und das Vorliegen bestimmter Strukturen, wie z.B. Dottersacktumor und trophoblastische Gewebe, vermögen die Variationen der serologischen TPA-Befunde innerhalb und zwischen bestimmten Organkarzinomgruppen zu erklären.
Erhöhte TPA-Serumwerte bei Sarkompatienten sind anhand der Befunde aber nicht zu erwarten.
So sind bei Keimzelltumoren des Hodens folgende Tumorkonstellationen mit serologischem TPA-Nachweis denkbar (Tab. 15).

TPA in KEIMZELLTUMOREN

Mögliche Tumorkonstellationen bei serologischem TPA-Nachweis

| POSITIV | NEGATIV |
|---|---|
| 1. Seminom mit synzytiotrophoblast.Riesenzellen | 1. Reines Seminom |
| 2. NSKZT | 2. Reines undifferenziertes embryonales Ca. |
| 2.1. mit drüsenbildendem Epithel | |
| 2.2. mit synz.-trophoblast. Riesenzellen oder Chorio-Ca. | 3. Komb.-Tumor aus 1.u.2. |
| 2.3. mit Dottersack-Tumor | |
| 3. Komb.-Tumor aus Seminom u. NSKZT wie 2. | |

Tab. 15

Gerade Dottersack- und Trophoblastgewebe reagieren intensiv TPA-positiv.
Das Vorkommen von TPA in extraembryonalen Geweben ist ein Indikator für das frühe ontogenetische Auftreten des Antigens.
Der theoretische Ansatz zur Histogenese, der die Dottersackstrukturen als ein relativ frühes, dynamisches Differenzierungsprodukt des Embryonalen Karzinoms versteht (TALERMAN 1980), findet sich durch die Ergebnisse der TPA-Darstellung bestätigt.
Kleine "Inseln" mit sinustumorartigem Aufbau in einem Embryonalen Karzinom, die ohne histochemische Anfärbung nicht ohne weiteres als Dottersacktumor zu erkennen sind, gehen aus ihrem Zellverband und Zellmorphologie direkt in die umgebenden undifferenzierten Zellen über. Verschiedene Übergangsstufen lassen sich dabei unterscheiden. Deutlich korreliert die Intensität der Immunperoxidase-Färbung für TPA mit dem

Reifegrad des Dottersackgewebes.
Beim Vergleich von AFP und TPA-Präparaten in 20 Fällen mit Dottersackelementen, weist das Anti-TPA beim Auffinden und in der immunhistologischen Anfärbung dem gängigen Anti-AFP gegenüber deutliche Vorteile auf. Unreife Dottersackanteile und atypische Zellen werden besser erfaßt.
Die Eigenständigkeit des Dottersacktumors als spezifische Differenzierungsform von NSKZT (TEILUM 1971), dürfte als gesichert angesehen werden.
Die Einbeziehung des Dottersacktumors in die Nomenklatur ist anzustreben, um auch die prognostische Bedeutung von Dottersackelementen bestimmen zu können, wie dies bei Chorionkarzinomanteilen bereits geschieht. Bisher liegt nämlich noch keine Studie vor, die den angeblich negativen Einfluß von Dottersackanteilen auf die Prognose der Patienten (TALERMAN 1975) untersucht.

In Übereinstimmung mit der Mitteilung Björklunds (BJÖRKLUND B. et al., 1973) über das Vorkommen von TPA in der Plazenta, können auch die chorialen Gewebe in KZT mit Anti-TPA nachgewiesen werden.
Trotz geringer, wahrscheinlich artefiziell bedingter Ausfälle bei der Darstellung einiger Anti-HCG-positiver Riesenzellen, eignet sich Anti-TPA gut zur Anfärbung trophoblastischer Elemente.
Vergleiche bei 19 NSKZT und 3 Seminomen mit sz.RZ. und 6 MTT mit zusammenhängedem trophoblastischem Gewebe ergeben ein gleichwertiges Färbeverhalten zum gängigen Anti-HCG.

Aus der Möglichkeit die beiden extraembryonalen Gewebe mit einem Antiserum gleichzeitig darzustellen, kann zeitlicher und finanzieller Nutzen gezogen werden.

Als Hilfsmittel für die morphologische Differentialdiagnose maligner Tumoren ist das TPA nur bedingt brauchbar.
Der diagnostische Informationsgewinn durch LP 34 ist durch das enge Spektrum der erfaßten Gewebe weit geringer anzusetzen.
In Anbetracht der negativen Reaktion in undifferenzierten Embryonalen Karzinomen und den sog. Stammzelltumoren, gelingt es nicht, diese Tumoren mittels TPA und LP 34 besser voneinander abzugrenzen. Wirklich entdifferenzierte Tumoren, seien sie germinalen, epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs, exprimieren offensichtlich überhaupt keine besonderen, zumindest keine bisher bekannten Marker mehr.
Die erhoffte Diagnosehilfe durch TPA wie auch durch andere "Tumorantigene" (NATHRATH und MEISTER 1982) bleibt folglich aus.
In einem Fall war es jedoch möglich, durch Anfärbung einer primitiven Drüsenstruktur zu zeigen, daß am Tumoraufbau zumindest eine nicht-seminomatöse Komponente beteiligt ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß das TPA als histologisches Differenzierungsantigen durchaus für bestimmte pathohistologische Fragestellungen interessant ist.
Auch eine Anwendung als klinisch-serologischer Marker zur Erkennung differenzierter Teratomstrukturen in Keimzelltumoren des Hodens erscheint möglich, und wird z.Zt. klinisch experimentell erprobt.
Anzustreben ist jedoch eine enge Korrelation von histologischer Tumorklassifikation und Serologie.
Das LP 34 bringt wegen der Beschränkung auf nur einen hochdifferenzierten Gewebetyp, der lichtmikroskopisch ohnehin leicht zu identifizieren ist, keinen Gewinn für die pathohistologische Diagnostik.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

An 20 nicht-seminomatösen Keimzelltumoren (NSKZT), 8 Kombinationstumoren, 11 Seminomen, 2 Leydigzelltumoren und 3 paratestikulären Geschwülsten, werden mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Technik am Paraffinschnitt nach Formalinfixierung und Protease-Vorbehandlung immunhistochemische Untersuchungen zum TPA- und LP 34-Nachweis durchgeführt.
Das Tissue Polypeptide Antigen (TPA) ist ein epitheliales Antigen und wurde von BJÖRKLUND aus einem Gemisch von verschiedenen Tumoren gewonnen. Seine größte Subfraktion, das TPA-B 1, ist eine unverzweigte Polypeptidkette mit einer definierten Aminosäuresequenz als spezifischer immunologischer Determinante und Arginin als kritischem Teil.
In klinisch-serologischen Studien wurden bei der Mehrzahl der Patienten mit unterschiedlichen primären Organkarzinomen, auch Hodentumoren, im Stadium der Tumorprogression erhöhte TPA-Spiegel nachgewiesen. Eine Korrelation zwischen Serologie und histologischer Klassifikation fehlt in den Studien.
Als LP 34 wird eine epidermale Zytokeratinfraktion bezeichnet, die bevorzugt in den apikalen und verhornenden Schichten der normalen menschlichen Haut anzutreffen ist.
Von folgender Fragestellung wurde ausgegangen:

1. In welchen Zellen der Tumoren treten TPA und LP 34 auf, und können Vergleiche zu normalen - oder anderen Tumorgeweben gezogen werden?

2. Ist TPA vorwiegend in proliferierenden Zellen nachweisbar, d.h. kann es als Proliferationsantigen gelten, wie aufgrund serologischer Studien angenommen wurde?

3. Lassen sich die klinisch-serologischen Häufigkeitsschwankungen der TPA-Werte in verschiedenen Organtumorkollektiven auch innerhalb einer Organtumorgruppe durch histologische Unterschiede der Tumoren erklären?

4. Sind TPA und LP 34 immunhistologisch als Hilfsmittel in der Differentialdiagnose maligner Tumoren nutzbar?

Keimzelltumoren des Hodens erscheinen wegen ihrer morphologischen Vielfalt zur Beantwortung dieser Fragen gut geeignet zu sein.
Es zeigt sich, daß TPA und LP 34 in ihrem Verteilungsmuster in germinalen Geschwülsten nicht von den für Normalgewebe vorliegenden Ergebnissen abweichen.
D.h. TPA ist im Zytoplasma von verschiedenartigem Drüsenepithel bis hin zu mäßig differenzierten Adenokarzinomverbänden nachweisbar. Epidermisartiges Plattenepithel reagiert negativ, Plattenepithelmetaplasien lassen graduelle Übergänge erkennen. Eine positive Reaktion findet sich in den extraembryonalen Dottersack- und Trophoblaststrukturen und in synzytiotrophoblastischen Riesenzellen in NSKZT und Seminomen. Undifferenziertes Embryonales Karzinom und typisches Seminom reagieren ebenso wie Leydigzellen, Tumoren dieser Zellart und typische und atypische Keimzellen nicht. TPA ist nie in nicht-epithelialen Zellen oder Gewebsstrukturen positiv.
LP 34 kennzeichnet auch in Keimzelltumoren die apikalen Zellagen und das Stratum lucidum des verhornenden Plattenepithels, Plattenepithelmetaplasien färben sich inkonstant an.

Als Schlußfolgerungen bieten sich an:

1. Gewebe in Keimzelltumoren unterscheiden sich im Auftreten zellulärer Strukturproteine nicht von Normalgeweben. Sie stellen also keinen grundsätzlich anderen Gewebetyp dar.

2. TPA ist in besonders schnell proliferierenden Geweben nicht nachweisbar, eine positive Reaktion gelingt erst in Epithelzellen von einer gewissen zytologischen und strukturellen Differenzierungshöhe an. Es ist deshalb als Differenzierungsmerkmal zu charakterisieren.

3. Die Reaktionsunterschiede in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und das Vorliegen bestimmter histologischer Strukturen können die Variationen der serologischen TPA-Befunde innerhalb und zwischen bestimmten Organkarzinomgruppen erklären. Eine Korrelation von Serologie und Histologie könnte damit gegeben sein.

4. Als Hilfsmittel für die Praxis der morphologischen Tumordifferentialdiagnose sind TPA und LP 34 nur bedingt geeignet.
   TPA erleichtert in KZT die Identifizierung von trophoblastischen Zellen und Dottersackanteilen. In Anbetracht der negativen Reaktion beider Antigene in undifferenzierten Zellen gelingt jedoch keine zuverlässige Hilfestellung bei der morphologischen Differentialdiagnose undifferenzierter germinaler, epithelialer und mesenchymaler Tumoren.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS :

1. ASH J. F., D. LOUVARD, S.J. SINGER:
Antibody-induced linkages of plasma membrane proteins to intracellular actomyosin-containing filaments in cultered fibroblast.
Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 74, 5584, 1977.

2. BJÖRKLUND B.:
Antigenicity of malignant and normal human tissues by gel diffusion techniques.
Int. Arch. Allergy, 8, 179, 1956.

3. BJÖRKLUND B., V. BJÖRKLUND:
Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cyto-immunological technique: presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen.
Int. Arch. Allergy, 10, 153, 1957.

4. BJÖRKLUND B., V. BJÖRKLUND, B. WIKLUND, R. LUNDSTRÖM, P.H. EKDAHL, L. HARBARD, K. KAIJSER, G. EKLUND, B. LÜNING:
A human tissue polypeptide related to cancer and placenta:
I. preparation and properties,
II. assay technique,
III. clinical studies of 1483 individuals with cancer and other conditions.
In: Immunological Techniques for Detection of Cancer, by Björklund B., Bonniers, Stockholm, 133, 1973.

5. BJÖRKLUND B., V. BJÖRKLUND, R. LUNDSTRÖM, G. EKLUND:
Tissue polypeptide antigen (TPA) in human cancer defence responsens.
In: The Reticuloendothelial System in Health and Disease: Immunologic and Pathologic Aspects, by Friedman H. and M.R. Escobar, Plenum, New York, 357, 1976.

6. BJÖRKLUND B.:
Tissue polypeptide antigen (TPA).
In: Laboratory Testing in Cancer, by Hautkamp H. and A. Högman, Folksam, Stockholm, 5, 1979.

7. BJÖRKLUND B.:
On the nature and clinical use of tissue polypeptide antigen (TPA).
Tumor Diagnostik, 1, 9, 1980.

8. BJÖRKLUND B., V. BJÖRKLUND:
TPA: Theorie und Praxis.
Vortragsskript vom 29.10.1981, Med. Klinik II im Klinikum Großhadern, Leitung: G. Paumgartner.
Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1981.

9. BJÖRKLUND B.:
Overview of TPA: specificity, immunochemistry, and biological basis.
Vortrag bei: 31st Colloquium: Protids of Biological Fluids, Brüssel, 1983.

10. BJÖRKLUND V., B. BJÖRKLUND, C. WITTELKIND, S.v.KLEIST:
Immunohistochemical localization of tissue polypeptide antigen (TPA) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer.
A comparative study.
Acta path.microbiol.immunol.scand.Sect.A., 90, 471,1982

11. BROWN N.J.:
"Yolk-sac tumour ("orchioblastoma") and other testicular tumours of childhood".
In: Pathology of the testis, by Pugh R.C.B. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 356, 1976.

12. BURNS J.:
"Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin embedded material."
Histochemistry, 43, 291, 1975.

13. CHEVASSU M.:
"Tumeurs du testicle."
Thèse, Steinhall, Paris, 1906.

14. CLARKE M., J.A. SPUDICH:
"Monmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination."
Annu.Rev. Biochem., 46, 797, 1977.

15. DAMJANOV J., D. SOLTER:
"Experimental teratoma."
Curr.Top.Pathol., 59, 69, 1974.

16. DEBUS E., K. WEBER, M. OSBORN:
"Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues."
EMBO J 1, 1641, 1982.

17. DIXON F.J., R.A. MOORE:
"Tumors of the male sex organs." (Atlas of Tumor Pathology).
Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1952.

18. EARLE J.D., M.A. BAGSHAW, H.S. KAPLAN:
"Supervoltage radiation therapy of the testicular tumors."
Am. J.Roentgenol., 117, 653, 1973.

19. EDELMAN G.M.:
"Surface modulation in cell recognition and cell growth."
Science, 192, 218, 1976.

20. EINHORN L. H., J. DONOHUE:
"Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer.
Ann. Intern. Med., 87, 293, 1977.

21. EKLUND G.:
"TPA-values and survival."
In: Laboratoy Testing in Cancer, by Hautkamp H. and A. Högman, Folksam, Stockholm, 17, 1979.

22. FUJIWARA K., T.D. POLLARD:
"Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow, and mitotic spindle of human cells."
J.Cell Biol., 71, 848, 1976.

23. GIGI O., B. GEIGER, Z.ESHHAR, R. MOLL, E. SCHMID, S. WINTER, D.L. SCHILLER, W.W. FRANKE:
"Detection of a cytokeratin determinant common to diverse epithelial cells by a broadly cross-reacting monoclonal antibody."
EMBO J 1, 1429, 1982.

24. GONZALEZ-CRUSSI F.:
"Extragonadal teratomas".
(Atlas of Tumor Pathology).
Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1982.

25. GRAHAM R.C., U. LUNDHOLM, M.J. KARNOVSKY:
Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-etylcarbazole.
J.Histochem. Cytochem., 13, 150, 1965.

52. PIERCE G.B., T.F. BEALS:
"The ultrastructure of primordial germinal cells of the fetal testes and of embryonal carcinoma cells of mice."
Cancer Res., 24, 1553, 1964.

53. PIERCE G.B., M.A. ABELL:
"Embryonal carcinoma of the testis".
In: Pathology Annual 1970, by Sommers S.C. (ed.)
Butterworth, London, 1971.

54. PUGH R.C.B. (ed.):
"Pathology of the testis."
Blackwell Scientific Publications,
Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.

55. PUGH R.C.B.:
"Testicular tumours."
In: Pathology of the Testis, by Pugh R.C.B. (ed.),
Blackwell Scientific Publications,
Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 139, 1976.

56. PUGH R.C.B., K.M. CAMERON:
"Teratoma".
In: Pathology of the Testis, by Pugh R.C.B. (ed.),
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London,
Edinburgh, Melbourne, 199, 1976.

57. REDELIUS P., B. LÜNING, B. BJÖRKLUND:
"Partial amino acid sequences of cyanogen bromide fragments of TPA subunit B 1."
Acta chem. Scand. B, 34, 265, 1980.

58. SCHAEFER H.E., R. FISCHER:
"Der Peroxidasenachweis an Ausstrichpräparaten sowie an Gewebsschnitten nach Entkalkung und Paraffineinbettung."
Klin. Wochenschr., 46, 1228, 1968.

59. SCHLEGEL G., M. LÜTHGENS, G. EKLUND, B. BJÖRKLUND:
"Correlation between activity in breast cancer and CEA, TPA, and eighteen common laboratory procedures and the improvement by the combined use of CEA and TPA."
Tumor Diagnostik, 2, 6, 1981.

60. SCHLEGEL R., S. BANKS-SCHLEGEL, G.S. PINKUS:
"Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues."
Lab.Invest., 42, 91, 1980.

61. SCHROEDER T.E.:
"Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1688, 1973.

62. SCHULZE C., A.F. HOLSTEIN:
"On the histology of human seminoma. Development of the solid tumor from intratubular seminoma cells."
Cancer, 39, 1090, 1977.

63. SKAEKKEBAEK N.E.:
"Carcinoma in situ of the testis: frequency and relationship to invasive germ cell tumors in infertile men."
Histopathology, 2: 117, 1981.

64. SLAWSON R.G.:
"Radiation therapy for germinal tumors of the testis."
Cancer, 42, 2216, 1978.

65. SLOANE J.P., M.G. ORMEROD:
"Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology."
Cancer, 47, 1786, 1981.

66. STEVENS L.C.:
"Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice."
J.Natl. Cancer Inst., 38, 549, 1967.

67. STEVENS L.C.:
"The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs."
J.Embryol. Exp. Morphol., 20, 329, 1968.

68. STEVENS L.C.:
"The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos."
Develop.Biol., 21, 364, 1970.

69. SKRYTEN A., B. UNSGAARD, B. BJÖRKLUND:
"Serum TPA related to activity in a wide spectrum of cancer conditions."
Tumor Diagnostik, 2, 117, 1981.

70. SZULMAN A.E.:
"The histological distribution of blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. III. The A,B, and H antigens in embryos and fetuses from 18 mm in length."
J.Exp.Med., 119, 503, 1964.

71. TAKAMIYA H., W.BODEMER, A. VOGT:
"Masking of protein antigen by modification of amino groups with carbobenzoxychloride (benzyl chloroformate) and demasking by treatment with nonspecific protease."
J.Histochem. Cytochem., 26, 914, 1978.

72. TALERMAN A.:
"The incidence of yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) elements in germ-cell tumors of the testis in adults."
Cancer, 36, 211, 1975.

73. TALERMAN A.:
"Endodermal sinus (yolk sac) tumor elements in testicular germ-cell tumors in adults: Comparison of prospective and retrospective studies."
Cancer, 46, 1213, 1980.

74. TEILUM G.:
"Endodermal sinus tumours of the ovary and testis. Comparative morphogenesis of the so-called mesonephroma ovarii (Schiller) and extraembryonic (yolk sac-allantoic) structures of the rat's placenta."
Cancer, 12, 1092, 1959.

75. TEILUM G.:
"Special tumors of ovary and testis."
Munksgaard, Copenhagen, 1971.

76. THACKRAY A.C., W.A.I. CRANE:
"Seminoma."
In: Pathology of the Testis, by Pugh R.C.B. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 164, 1976.

77. VANDEPUTTE M., H. SOBIN, A. BILLIAU, B. van de MAELE, R. LEYTEN:
"In utero tumor induction by murine sarcoma virus (Moloney) in the rat.
I.Biological characteristics."
Int.J.Cancer, 11, 536, 1973.

78. WIKLUND B., B.LÜNING:
"Further immunochemical studies of tissue polypeptide antigen (TPA)."
In: Protides of the Biological Fluids, 28th Colloquium 1981, by Peeters H. (ed.), Pergamon Press, Oxford, New York, 143, 1982.

79. WILLIS R.A.:
"Pathology of tumors."
Butterworth, London, 1960³.

80. WITTING C.:
"Immunofluorescence studies on formalin-fixed and paraffin-embedded material."
Beitr.Path., 181, 288, 1977.

81. WOODTLI W., C. HEDINGER:
"Endodermal sinus tumor or orchioblastoma in children and adults."
Virch. Arch. A. (Pathol.Anat.), 364, 93, 1974.

82. WURSTER K.:
"Klassifizierung testikulärer Keimzellgeschwülste. Neue Gesichtspunkte aufgrund morphogenetischer Studien."
Normale und Pathologische Anatomie, Heft 31, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.

Mein besonderer Dank gilt
Herrn Prof. Dr.med. Udo Löhrs
für die Überlassung des Themas, das
stets wohlwollende Interesse und die
wertvollen Anregungen.

Herrn Prof. Dr.med. Max Eder
danke ich für die Möglichkeit in sei-
nem Institut zu promovieren.

Herrn Dr.med. Walter Nathrath
danke ich für seine Unterstützung und
Ratschläge bei der Immunhistochemie.

Herzlich danken möchte ich
Herrn Prof. Dr.med. B. Björklund und
Herrn Prof. Dr.med. W. Franke für die
Überlassung der Antiseren.

Frau Petra Graf
danke ich für die ausgezeichnete Anlei-
tung bei der Herstellung der Präparate.

Frl. Ulrike Eber
danke ich für die sorgfältige Anfertigung
des Manuskriptes.

# L e b e n s l a u f

| | |
|---|---|
| Name: | Gustavo Bruno Baretton |
| geboren: | 18.01.1959 |
| in: | München |
| Bekenntnis: | röm.-kath. |
| Vater: | Gustavo Bruno Baretton, Kaufmann<br>geb.: 6.12.05; gest. 7.3.79. |
| Mutter: | Anna Maria Erika Baretton,<br>geb. Burger, kaufm. Angestellte,<br>geb.: 12.9.24. |

Schulbildung:

| | |
|---|---|
| 1965-69: | Grundschule am Canisiusplatz (München) |
| 1969-78: | Ludwigsgymnasium München |
| Juni 78: | Abitur |

Hochschulstudium:

| | |
|---|---|
| 1978-84: | Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| Aug. 80: | Ärztliche Vorprüfung |
| Aug. 81: | 1. Abschnitt d. Ärztl. Prüfung |
| Aug. 83: | 2. Abschnitt d. Ärztl. Prüfung |
| Okt. 84: | 3. Abschnitt d. Ärztl. Prüfung |
| 19.10.84: | Ärztliche Approbation |